

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年3月7日 (07.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/18562 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/76, 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10, C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, 33/15
- (74) 代理人: 前田純博(MAEDA, Sumihiro); 〒100-0011 東京都千代田区千代田2丁目1番1号 帝人株式会社 知的財産センター内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/07349
- (22) 国際出願日: 2001年8月28日 (28.08.2001)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-257104 2000年8月28日 (28.08.2000) JP
特願2001-59753 2001年3月5日 (05.03.2001) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED) [JP/JP]; 〒541-0054 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 江口広志 (EGUCHI, Hiroshi) [JP/JP]. 一寸木学 (CHOKKI, Manabu) [JP/JP]. 山村 聡 (YAMAMURA, Satoshi) [JP/JP]. 三田麗子 (MITA, Reiko) [JP/JP]. 榎木津希夫 (MASEGI, Tsukio) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドダンスノート」を参照。

(54) Title: AIRWAY-SPECIFIC TRYPSIN-LIKE ENZYMES AND METHOD OF USING THE SAME

WO 02/18562 A1

(54) 発明の名称: 気道特異的トリプシン様酵素およびその利用法

(57) Abstract: A method of screening a compound or a polypeptide which inhibits AST activity, or inhibits PAR activation, mucus production promotion, cell proliferation, calcium flow into cells or EGFR pathway activation by AST; and a method of assaying AST *in vivo* and in biological cells or samples. ASTs which are mammalian AST proteins comprising the whole amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or 2 or a part thereof, or an amino acid sequence having a 66% homology with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and in which a propeptide moiety is bonded to a trypsin-like moiety via a disulfide bond; nucleic acids encoding the same; antibodies binding to the same; a method of assaying AST by using these antibodies; and a method of assaying the AST inhibitory activity or the activity of inhibiting PAR activation, mucus production promotion, cell proliferation, calcium flow into cells or EGFR pathway activation by AST of a compound or a polypeptide to be assayed.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明の課題は、AST活性を阻害、またはASTによるPAR活性化、粘液産生亢進、細胞増殖、細胞内カルシウム流入またはEGFR経路活性化を阻害する化合物もしくはポリペプチドのスクリーニング方法を提供する。さらに生体内および生体より得られた細胞や試料中のASTの測定方法を提供する。

本発明は、配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる蛋白または配列番号1に示されるアミノ酸配列と66%以上のホモロジーを有する哺乳類AST蛋白であって、プロペプチド部分とトリプシン様蛋白部分とがジスルフィド結合で連結されているAST。それらをコードする核酸。それらに結合する抗体。かかる抗体を用いてASTを測定する方法。さらには測定対象化合物もしくはポリペプチドのAST阻害活性、またはASTによるPAR活性化または粘液産生亢進、細胞増殖、細胞内カルシウム流入またはEGFR経路活性化の阻害活性を測定する方法である。

明 細 書

気道特異的トリプシン様酵素およびその利用法

5 技術分野

本発明は新規に構造が明らかにされた気道特異的トリプシン様酵素蛋白に関する。また、本発明は該酵素の粘液分泌促進作用、炎症惹起作用、細胞内カルシウム流入惹起作用、プロテアーゼ活性化受容体活性化作用の検出もしくは測定系を用いた、化合物またはポリペプチド（蛋白および抗体を含む）の阻害活性検出法に関する。

10

背景技術

近年、ヒトの慢性気道炎症患者の喀痰中からヒト気道トリプシン様酵素（以下、「気道特異的トリプシン様酵素」または「AST」（Airway Specific Trypsin-like Protease）という。）が精製され（特開平7-067640号公報、Yasuoka S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 16: p300-308, 1997）、そのアミノ酸配列およびcDNA配列が明らかになっている（特開平8-89246号公報、US-5804410、EP-699763、Yamaoka K. et al., J. Biol. Chem., 273(19): 11895-11901, 1998）。

この酵素のもつ活性については *in vitro* でいくつか検討がなされている。

20 粘液繊毛運動に対する関与をはじめ、ヒト気管支上皮細胞株からのIL-8、GM-CSFなどのサイトカインの産生増強作用を有することから（寺尾紀子ら、1998年度日本呼吸器学会）、気道炎症の病態への関与の可能性が考えられる。さらに、フィブリノーゲンの分解活性（Yoshinaga S. et al., J. Med. Invest., 45: 77-86, 1998）、およびプラスミノゲンアクティベーター（プロウロキナーゼ）活性化作用などの酵素活性を有していることから（吉永純子ら、1998年度病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会（Conference on Proteases and Inhibitors in Pathophysiology and Therapeutics））、気道粘膜面におけるフィブリン形成を介して抗炎症的に作用したり、慢性気道疾患ではその病態を修飾している可能性が想定され、さらに癌転移などに関与している可能性も考えられている。

25 一方、プロテアーゼ活性によりシグナル伝達が惹起される受容体と定義されるプロテアーゼ活性化受容体（Protease Activated Receptor、以下「PAR」ともい

30

う。)は、プロテアーゼによるシグナルを仲介している受容体であり、1991年にヒト血小板に存在するトロンビン受容体(ヒトPAR-1)がクローニングされた(Vu U K-H et al., Cell, 64: 1057-1068, 1991)。その後、マウスPAR-1 (Coughlin, S. R., Unpublished, Accession No. L03529, 1992)、ラットPAR-1 (Runge M. S. et al., J. Biol. Chem., 267: 16975-16979, 1992)、マウスPAR-2 (Nystedt S. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91: 9208-9212, 1994)、ヒトPAR-2 (Bohm S. K., Biochem. J., 314: 1009-1016, 1996)、ラットPAR-2 (Saifeddine M. et al., Br. J. Pharmacol., 118 (3): 521-530, 1996)、ヒトおよびマウスPAR-3 (Ishihara H. et al., Nature, 386: 502-506, 1997)、マウスPAR-4 (Kahn M. L. et al., Nature, 394: 690-694, 1998)、ヒトPAR-4 (Xu W-F et al., Proc Natl Acad Sci USA, 95: 6642-6646, 1998)などがこれまでにクローニングされている。PAR-1およびPAR-2に関しては、炎症反応など様々な病態に関与しているという報告がこれまでに多数なされている(Dery O. et al., Am. J. Physiol., 274: C1429-C1452, 1998)。

PAR-2の活性化に関しては、トリプシン(Nystedt S. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91, 9208-9212, 1994)およびトリプターゼ(Schwartz, L. B. et al., J. Immunol., 126: 1290-1294, 1981)がPAR-2を活性化することが報告されている(Molino M. et al., J. Biol. Chem., 272: 4043-4049, 1997)。

PAR-2は、膵臓において膵液の分泌を調節したり(Bohm S. K., Biochem. J., 314: 1009-1016, 1996)、イオンチャネルの活性化などに関与しているという報告(Nguyen T. D. et al., J. Clin. Invest., 103: 261-269, 1999)の他、十二指腸の運動の調節などにも関与しているという報告がある(Kawabata A. et al., Br. J. Pharmacol., 128(4): 865-872, 1999)。

一方、トリプターゼはマストセルから放出され、4量体としてのみ酵素活性を示し(Schwartz, L. B. et al., J. Biol. Chem., 256: 11939-11943, 1981)、皮膚炎症(Steinhoff M. et al., Exp. Dermatol., 8: 282-294, 1999)や肺の炎症(Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 278: L193-L201, 2000)に関与していることを示唆する報告がなされている。

しかし、トリプターゼの作用とPAR-2の活性化に関してはまだ不明な点が多く、その他のPAR-2活性化酵素に関してはまったく未解明である。さらに気道においてPAR-2を活性化する酵素として、上述のトリプシノーゲンの気道における存在

を示唆する報告があるが、その活性や存在量に関しては全く不明であり、免疫組織染色により反応する蛋白の存在が示されているだけである (Cocks T. M. et al., *Nature*, 398: 156-160, 1999)。まして気道特異的に PAR 2 を活性化する酵素が存在することに関しては全くこれまで報告がない。

- 5 一方、慢性気道炎症疾患において、持続的な炎症とともに問題とされている病態として粘液分泌の過剰亢進による病態の悪化が挙げられる (Jeffery, P. K. et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 150: S6-13, 1994)。上記疾患に属する DPB (びまん性汎細気管支炎) に対するエリスロマイシンのようなマクロライド系の薬剤の効果が日本において知られているが (Nagai, H. et al., *Respiration*, 58
10 (3-4): 145-149)、抗生物質であるため、欧米などでは好んで使用されているわけではない。

- さらに粘液の過剰産生亢進や分泌細胞の増生に関して、主たる原因となるターゲット分子に関しては種々の説があるものの (Christian, P. et al., *J. Clin. Invest.*, 85: 682-689, 1990)、それらに基づいて創製された薬剤の中に有効な治療薬
15 はいまだ存在していない。よって、COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) に代表される慢性気道炎症性疾患において、粘液の過剰な分泌産生亢進を抑制する有効な薬剤が世界的に望まれている。

発明の開示

- 20 本発明の課題は、活性を有する真の構造の AST 取得である。

- また、活性を有する真の構造の AST による粘液産生亢進作用、EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 経路活性化作用、サイトカイン産生亢進などによる炎症亢進作用、細胞内カルシウム流入惹起作用、PAR (プロテアーゼ活性化受容体、プロテアーゼ活性によりシグナル伝達惹起される受容体と定義する) 活性化
25 作用を阻害する薬剤をスクリーニングする方法およびその阻害活性を検出するための評価系の構築である。

- さらに、該構造を有する AST の活性を阻害する化合物またはポリペプチド (蛋白および抗体を含む)、または該構造を有する AST の粘液産生亢進作用、EGFR 経路活性化作用、炎症亢進作用、細胞内カルシウム流入惹起作用、PAR 活性化
30 作用を阻害する化合物またはポリペプチドの薬効評価系を提供することである。

また、該構造の酵素と結合する抗体を取得し、測定系を構築することにより、分

泌系の異状、炎症性の疾患、凝固線溶系の異状、癌などの診断を行う手段を提供することである。

- すなわち、本発明方法を利用することにより得られたAST活性を阻害する化合物もしくはポリペプチド、またはASTによる粘液産生亢進作用、炎症亢進作用、
- 5 細胞内カルシウム流入作用、PAR活性化作用、EGFR経路活性化作用を阻害する化合物もしくはポリペプチドは、ASTのもつ分泌細胞に対する分泌促進あるいは粘液産生亢進作用、凝固・線溶系における作用、気道リモデリングへの作用、気道炎症への作用、線維芽細胞・上皮細胞・せん毛細胞・平滑筋細胞・杯細胞の増殖および障害に対する作用、癌の増殖や転移に関する作用、粘液纖毛運動に対する作用、
- 10 抗ウイルス感染作用等の生理作用を抑制もしくは修飾し、病態における改善および治療に用いることが期待できる。

- さらにASTがPARを活性化することから、PARのもつ分泌細胞に対する分泌促進作用（粘液腺細胞、漿液腺細胞、杯細胞の粘液産生亢進作用、神経細胞・神経内分泌細胞への分泌亢進作用、気道上皮細胞におけるクロライドイオン分泌促進
- 15 作用など）、上皮細胞あるいは内皮細胞を介した血管、気道、腸管などの弛緩作用や、平滑筋に対する収縮作用、線維芽細胞や上皮細胞などの炎症性サイトカイン産生誘導および増強作用、線維芽細胞・上皮細胞（纖毛細胞、杯細胞、基底細胞）・平滑筋細胞・分泌腺細胞などの細胞増殖および障害に対する作用、神経細胞に対する過敏性の増強作用等の生理作用を抑制もしくは修飾し、病態における改善および
- 20 治療に用いることが期待できる。

- さらにASTがEGFR経路を活性化することから、EGFR活性化による作用として、分泌細胞（粘液腺細胞、漿液腺細胞、杯細胞、扁平上皮細胞、癌細胞など）に対する分泌物産生亢進作用やサイトカイン産生亢進作用、線維芽細胞や内皮細胞、上皮細胞、平滑筋細胞などEGFR経路を有する様々な細胞に対する炎症性
- 25 サイトカイン産生誘導および増強作用、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、せん毛細胞、杯細胞、基底細胞、扁平上皮細胞、癌細胞、平滑筋細胞、分泌腺細胞などEGFR経路を有する様々な細胞に対する細胞増殖作用等の生理作用を抑制もしくは修飾し、病態における改善および治療に用いることが期待できる。

- 以上のASTの直接的、間接的な作用から、慢性気道炎症（慢性閉塞性肺疾患
- 30 （慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、気管支拡張症を含む）、気管支喘息）、副鼻腔気管支症候群、肺線維症、気道過敏症、肺高血圧症、凝固線溶系異

常による疾患、広義の気道組織の癌、関節炎、皮膚の炎症性の疾患のための新しい治療薬スクリーニングの評価系、診断薬となり得るものである。

本発明者らは、以上の状況を鑑みてASTの精製方法に関して鋭意研究した結果、
5 活性を有するASTを喀痰中あるいは組換え昆虫細胞から効率よく精製する方法を確立した。その結果、より多くのASTの取得が可能となった。この取得された精製蛋白を使用し、アミノ酸配列を決定した結果、精製されたASTの活性体の構造が、従来報告されていたトリプシン様蛋白類似のアミノ酸構造以外に、プロペプチドとトリプシン様蛋白部分がジスルフィド結合により連結された構造を有する蛋白
10 構造をもつ活性体が存在することを初めて明らかにした。

また、この酵素が気道組織、ことに気管支上皮や気管支腺、なかでも線毛上皮細胞、基底細胞に特異的に多く発現し、存在することを見出した。さらに該構造を有するASTがPARを活性化する能力を有することを知見した。また、ASTが呼吸器由来の粘液分泌能を有する細胞株において粘液の産生量を亢進することを知見
15 した。本発明者らはこれらの知見に基づきさらに研究を進めた結果、本発明に到達した。

本発明者らは昆虫細胞でHAST(すなわちヒトAST)のcDNA配列(特開平8-89246号公報、US-5804410、EP-699763、およびYamao
20 ka K. et al., J. Biol. Chem., 273 (19): 11895-11901, 1998)に基づき、組換えバキュロウイルスベクターを作製し、組換え蛋白を発現させた。ここから実施例1に示した精製方法により活性を有する蛋白を精製し、活性蛋白の一次構造を決定した結果、従来報告されているトリプシン類似の構造蛋白(特開平7-067640号公報、S.Yasuoka et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 16: p300-308, 1997、187番目のイソロイシン(Ile)から始まるトリプシン様蛋白部分)以外に、
25 1番目のメチオニン(Met)から186番目のアルギニン(Arg)の間のアミノ酸配列からなるプロペプチドの一部の部分配列(具体的には145番目のアスパラギン(Asn)あるいは162番目のアスパラギン酸(Asp)からはじまるプロペプチド部分)がトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合している構造からなる蛋白を含んでいることを見出した。そして、この構造を有する蛋白
30 が活性のあるASTの主成分であることを発見した。

さらに、天然HASTを喀痰中から精製し、同様にアミノ酸配列を決定した結果、やはりプロペプチドの一部の部分配列（具体的には173番目のイソロイシン（Ile）からはじまるプロペプチド部分）が187番目のイソロイシン（Ile）から始まるトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合する構造蛋白が存在することを発見した。そして、この構造の蛋白が活性をもつASTの主成分であることを発見した。

一方、これまでHASTはヒトに特異的に存在すると考えられており、HAT（Human Airway Trypsin-like Protease）と命名されていた（特開平7-067640号公報、S.Yasuoka et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 16: p300-308, 1997）。しかし、本発明者らがいくつかのセリンプロテアーゼのホモロジーに基づいて作製したdegenerateプライマーを用い、マウスの気道より作製したcDNAを鋳型とするPCR（Polymerase Chain Reaction）を施行し、得られたDNAフラグメントの配列を決定した結果、直立二足歩行を行わないマウスなどの動物においてもHAST様蛋白が存在することをはじめて見い出した。さらに、マウスのAST様蛋白をコードする全長cDNAを5'-RACE（Rapid Amplification of cDNA Ends）、3'-RACEを施行することによって取得した。本発明者らは、この遺伝子発現の組織特異性を調べたところ、マウスにおいても気道特異的な発現が観察された。さらにこのようにして取得されたマウスAST遺伝子を昆虫細胞において組換え体として発現させ、その蛋白一次構造を決定した結果、マウスASTもヒトAST（HAST）と同様に、1番目のメチオニン（Met）から186番目のアルギニン（Arg）の間のアミノ酸配列からなるプロペプチドの部分配列が187番目のイソロイシン（Ile）から始まるトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合している構造からなる酵素であることを明らかにした。同様の方法で、ハムスター、モルモットのASTのクローニングにも成功した。

また、上記と同様の方法を用い、サル、ブタ、イヌ、ウサギ、ウシなどの高等哺乳動物においてもHAST様蛋白が存在することを初めて見い出した。具体的にはヒトおよびげっ歯類のASTのcDNA配列を基にデザインしたdegenerateプライマーを作製し、気道から抽出した全RNAから合成したcDNAを鋳型としてPCRを行い、ASTの部分cDNA配列を増幅し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列を基にRACE用プライマーを作製し、5'-RACE、3'-RACEを施行することによってHAST様蛋白をコードする全長cDNAを取得した。この

ようにして取得した哺乳類AST遺伝子をヒト培養細胞において一過性に発現させたところ、ヒトAST (HAST) と同様のトリプシン様活性を発現しうることが明らかとなった。さらに、サルAST遺伝子を昆虫細胞において組換え体として発現させ、その蛋白一次構造を決定した結果、I I G Gから始まるトリプシン様蛋白部分のN末端アミノ酸配列とD Q A Aから始まるプロペプチドの一部のアミノ酸配列が等モルで検出された。そしてサルASTもヒトASTと同様に、1番目のメチオニン (Met) から186番目のアルギニン (Arg) の間のアミノ酸配列からなるプロペプチドの部分配列が、187番目のイソロイシン (Ile) から始まるトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合している構造からなる酵素であることを明らかにした。

以上に述べた動物におけるASTの存在の発見は、動物のASTの遺伝子レベルあるいは蛋白レベルの発現を評価することを可能とし、動物疾患モデルにおいて動物ASTの発現や活性を評価することにより、該病態におけるASTの関与を明確にしていくのに非常に有用である。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてASTの発現を抑制したり、発現ベクターを導入してASTの発現を上昇せたりすることにより、病態モデル動物におけるASTの関与を調べることができる。さらに、動物モデルにおいてAST阻害剤あるいは阻害ポリペプチド (蛋白、抗体を含む) の薬効を評価するうえで重要となる、動物における種差を検討、評価するうえでも重要な情報を提供するものである。

つぎに、上記構造を有する組換えASTを組換えPAR発現昆虫細胞に作用させ、カルシウム流入を指標にPARの活性化を評価したところ、PAR1およびPAR2を発現させた昆虫細胞においてカルシウム流入を惹起し、ASTがPARを活性化することをはじめて見出した。

さらに、正常ヒト気道上皮細胞および気道上皮細胞株においてASTがPARを活性化し、カルシウム流入を惹起すること、および該構造のASTがPARを介したシグナル伝達系によりIL-8産生増強や細胞増殖を引き起こすことをはじめて見出し、気道疾患においてASTがPARを介したシグナル伝達系によりその病態を修飾していることを明らかにした。そして、これに基づいて上記構造を有する組換え蛋白の酵素活性またはPAR活性化作用に基づくスクリーニング系を構築した。

さらに、ヒト粘液分泌細胞株において、該構造のASTが粘液産生を亢進すること、細胞内カルシウム流入を惹起すること、さらにはEGFR経路を活性化するな

どしてIL-8産生増強や細胞増殖を引き起こすことをはじめて見出した。そして
粘液産生の亢進した慢性気道疾患においてASTが粘液産生を亢進すること、細胞
内カルシウム流入惹起などを起こすこと、およびPAR、EGFR経路を活性化す
るなどしてIL-8産生増強や細胞増殖を引き起こすことにより、その病態を修飾
5 していることを明らかにした。

さらに、これに基づいて上記構造を有する組換え蛋白の酵素活性または粘液産生
亢進作用、PAR活性化作用、細胞内カルシウム流入惹起作用、EGFR経路活性
化作用およびIL-8産生増強作用または細胞増殖促進作用に基づくスクリーニン
グ系を構築しうることを見出し、本発明を完成した。

10

すなわち本発明は、プロペプチド部分がトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結
合を介して結合する構造を有したASTである。

さらに該構造を有する酵素の粘液産生亢進作用、PAR活性化作用、細胞内カル
シウム流入惹起作用、EGFR経路活性化作用およびIL-8産生増強作用または
15 細胞増殖促進作用を指標とした阻害剤または阻害ポリペプチドのスクリーニング系
である。

さらに本発明には、かかる構造のASTを産生する昆虫細胞等の動物細胞も含ま
れる。

また、該構造を有する酵素と結合する抗体であって、酵素免疫測定法により生体
20 内の該酵素を検出し得る結合性を有するモノクローナル抗体もしくはポリクローナ
ル抗体、または免疫組織染色において組織中および細胞中の該酵素を検出し得る結
合性を有するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、または該酵素活性
を阻害し得るモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体である。

さらに、本発明にはかかるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞等
25 の動物細胞も含まれる。

本発明をさらに具体的に述べると以下ようになる。

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる蛋白であつ
て、1番目のMetから186番目のArgの間のアミノ酸配列の全部もしくは一
部からなるプロペプチド部分と、187番目のIleから418番目のIleまでの
30 232アミノ酸の配列からなるトリプシン様蛋白部分とが1本のジスルフィド結合
で連結されている構造を有するAST。

(2) 配列番号1に示されるアミノ酸配列と66%以上のホモロジーを有する哺乳動物のASTカウンターパート蛋白であって、該プロペプチド部分に相当する部分と該トリプシン様蛋白部分に相当する部分とが1本のジスルフィド結合で連結されている構造を有する哺乳動物AST。

- 5 (3) 配列番号2、27、29、31、33、35、37、または39に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる蛋白であって、1番目のMetから185番目もしくは186番目のArgの間のアミノ酸配列の全部もしくは一部からなるポリペプチド部分と、186番目または187番目のIleから417番目または418番目のIleもしくはValまでの232アミノ酸の配列からなるポリペ
10 プチド部分とが1本のジスルフィド結合で連結されている構造を有する哺乳動物AST。

(以下、上記(1)から(3)のいずれかの構造を有するASTを、単に「気道特異的トリプシン様酵素」もしくは「AST」と記載する。)

- 15 (4) ASTに特異的に結合する抗体。

(5) ヒトAST活性を阻害するか、またはその活性化を阻害するモノクローナル抗体。

(6) 前記抗体を用いてASTを検出または測定する方法。

- (7) 酵素基質と測定対象化合物もしくはポリペプチドを混合し、これらとAST
20 もしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織を適切な条件下にインキュベートして該酵素基質と反応させ、その反応生成物を測定することにより測定対象化合物もしくはポリペプチドのAST阻害活性を検出する方法。

- (8) ASTもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物
もしくはポリペプチドと、さらにPAR発現細胞とを混合し、PAR活性化を指標
25 として測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによるPAR活性化の阻害活性を検出する方法。

- (9) ASTもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物
もしくはポリペプチドと、さらに細胞内カルシウム流入能を有する細胞とを混合し、
細胞内カルシウム流入を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドのAST
30 による細胞内カルシウム流入の阻害活性を検出する方法。

(10) ASTもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合

物もしくはポリペプチドと、さらに粘液分泌能を有する細胞とを混合し、分泌物を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによる粘液産生亢進作用の阻害活性を検出する方法。

(11) ASTもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物
5 物もしくはポリペプチドと、さらにEGFR-L (EGFR-リガンド) を有する細胞とを混合し、EGFR-Lの遊離量を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによるEGFR-Lの遊離能の阻害活性を検出する方法。

(12) ASTもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物
10 物もしくはポリペプチドと、さらにEGFRシグナル伝達経路を有する細胞とを混合し、EGFR経路のシグナル伝達を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによるEGFRシグナル伝達系活性化作用の阻害活性を検出する方法。

(13) 天然哺乳類AST遺伝子のコード領域。

(14) 哺乳類AST遺伝子由来のmRNAまたはcDNA。 ([例] 配列番号3、
4、5、6、26、28、30、32、34、36、38)

15 (15) 哺乳類AST。

(16) 前記(13)または(14)の核酸を用いて作製された発現ベクター。それがトランスフェクトもしくはトランスフォームされた細胞。その細胞からASTを精製する方法および精製されたAST。

(17) 前記核酸の全体もしくは一部の情報を用いて、それらの核酸に対応するA
20 ST遺伝子の発現量を検出する方法。

(18) ASTの活性化過剰もしくはアプレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与することからなる、ASTの活性を阻害、または該酵素の活性化を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。

25 (19) ASTによる粘液産生亢進、炎症亢進、細胞内カルシウム流入惹起、EGFR経路活性化、PAR活性化により特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与することからなる、ASTによる粘液産生亢進作用、サイトカイン産生亢進などによる炎症亢進作用、細胞内カルシウム流入作用、PAR活性化作用、EGFR経路活性化作用を阻害する物質のスクリー
30 ニング方法またはその治療効果判定方法。

(20) ASTの活性化過剰もしくはアプレギュレートにより特徴づけられる疾

患をもつ哺乳類に対し、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する薬剤を投与することにより、ASTの活性阻害またはその活性化阻害による治療効果を判定する方法。

5 図面の簡単な説明

図1は、EGF-L添加による粘液分泌細胞株NCI-H292におけるAB-PAS染色結果を示す。

図2は、本発明のHASTまたはEGF-L添加による粘液分泌細胞株NCI-H292におけるAB-PAS染色結果を示す。

10 図3は、本発明のHASTおよびセリンプロテアーゼ阻害剤添加による粘液分泌細胞株NCI-H292におけるAB-PAS染色結果を示す。

図4は、本発明のHASTあるいは加熱処理HAST添加による粘液分泌細胞株NCI-H292におけるAB-PAS染色結果を示す。

図5は、本発明のHASTを添加した粘液分泌細胞株NCI-H292にプロテ
15 アーゼ阻害剤を同時に添加したときのMuc5ACのmRNA量の測定結果を示す。

図6は、本発明のHASTを添加した粘液分泌細胞株NCI-H292にEGF-R中和抗体あるいはプロテアーゼ阻害剤を同時に添加したときのMuc5ACのmRNA量の測定結果を示す。

図7は、本発明のAST、トリプシン、トリプターゼ、またはエラスターゼを添
20 加した粘液分泌細胞株NCI-H292におけるMuc5ACのmRNA量の測定結果を示す。

図8は、本発明のASTによる気道上皮細胞株BEAS-2BからのIL-8遊離亢進がプロテアーゼ阻害剤により抑制される測定結果を示す。

図9は、本発明のASTによる気道上皮細胞株BEAS-2BからのIL-8遊
25 離亢進が転写レベルで起こることを示す。

図10は、本発明のASTが粘液分泌細胞株NCI-H292においてEGFRのチロシンリン酸化を亢進させたことを示す。

図11は、ヒトASTとマウスASTのアミノ酸配列の相同性を比較した図である。

30 図12は、本発明のASTによるPAR発現昆虫細胞におけるカルシウム流入を示す。

図13は、正常ヒト気道上皮細胞を用いた本発明のASTによるカルシウム流入を示す。

図14は、気道上皮細胞株を用いた本発明のASTによるカルシウム流入を示す。

図15は、本発明の抗AST抗体の阻害活性の評価結果を示す。

5 図16は、本発明の抗ASTポリクローナル抗体を用いた測定系の、組換えASTに対する標準曲線を示す。

図17は、本発明の抗ASTポリクローナル抗体を用いた測定系により喀痰中のASTを測定した結果を示す。

10 図18は、本発明の抗ASTモノクローナル抗体と抗ASTポリクローナル抗体の組換えASTに対する液相抗原反応性を調べた結果を示す。

図19は、本発明の抗ASTモノクローナル抗体と抗ASTポリクローナル抗体を用いた測定系の、組換えASTに対する標準曲線を示す。

発明を実施するための最良の形態

15 配列番号1に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる本発明の気道特異的トリプシン用酵素においては、プロペプチド部分とトリプシン様蛋白部分とが173番目のCysと292番目のCysとのジスルフィド結合で連結されているものが好ましい。配列番号2に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる本発明の気道特異的トリプシン用酵素については、プロペプチド部分に相当する部
20 分とトリプシン様蛋白部分に相当する部分が172番目のCysと291番目のCysとのジスルフィド結合で連結されているものが好ましい。配列番号1に示されるアミノ酸配列と66%以上のホモロジーを有する本発明の哺乳類気道特異的トリプシン用酵素については、プロペプチド部分に相当する部分とトリプシン様蛋白部分に相当する部分とが、配列番号1に示されるASTのそれぞれ173番目のCys
25 sと292番目のCysに相当するシステイン部分とのジスルフィド結合で連結されているものが好ましい。

ヒトASTの場合、かかるプロペプチド部分としては、そのN末端（アミノ末端）アミノ酸が、1番目のMetから170番目のIleの間のアミノ酸であるもの、44番目のAspから170番目のIleの間のアミノ酸であるもの、145
30 番目のAsnから170番目のIleの間のアミノ酸であるものが好ましい。特に145番目のAsn、162番目のAspもしくは170番目のIleのいずれか

から、C末端（カルボキシ末端）が186番目のArgまでであるものが好ましい。
162番目のAspもしくは170番目のIleのいずれかから、186番目のArgまでであるものが最も好ましい。

本発明の前記ASTに特異的に結合する抗体としてはモノクローナル抗体が好ま
5 しく、ヒトAST活性を阻害するか、またはその活性化を阻害するものが特に好ましい。

本発明の抗体を用いるASTの検出または測定方法としては、酵素免疫測定法を用いるものが好ましい。

本発明の、測定対象化合物もしくはポリペプチドのAST阻害活性スクリー
10 グ方法において使用されるASTあるいはAST発現細胞は、本発明の構造を有するASTあるいは該ASTを産生している細胞であればよく、AST発現細胞もしくは器官、組織が口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織由来であるか、またはそれらの組織に由来する細胞もしくはそれらの細胞株であるものが好ましい。かかる組織に由来する細胞もしくは細胞株
15 には、癌細胞、癌細胞株が含まれる。特に上皮細胞、ことに線毛上皮細胞あるいは基底細胞もしくはそれら由来の細胞株が好ましい。評価に供するには精製された、前記構造を有する本発明のASTが最も好ましい。

本発明の、測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによる粘液産生亢進作用に対する阻害活性のスクリーニング方法において、粘液産生亢進作用の指標とし
20 ては、粘液糖タンパクのAB-PAS染色法による染色量、高分子硫酸ラベル体の放出量、ムチンの産生量、ムチン（特にMuc5AC）のmRNA発現量、ムチン（特にMuc5AC）のプロモーターの転写活性、EGFレセプターのリガンドの産生量または遊離量、EGFレセプターシグナル伝達経路に参与する蛋白のチロシンリン酸化体の量、MAPK(MAP kinase)のリン酸化体の量が好ましく
25 挙げられる。

本発明の、測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによるEGFR経路活性化作用に対する阻害活性スクリーニング方法において、EGFR経路活性化の指標としては、EGFR-L (EGFR-Ligand) の切断や遊離量、またはすでに報告されているEGFRシグナル伝達系 (Wells A., Int. J. of Biochem. & C
30 ell Biology, 31: 637-643, 1999) の測定対象物、またはそのシグナル伝達の結果おこる現象などを用いてASTによるEGFRシグナル伝達系の活性化を測定する

ことが可能である。

例えば、細胞増殖アッセイや、NF κ B、AP-1などの転写エレメントを含む遺伝子（IL-8、IL-6、GM-CSFなど）の転写活性や生成蛋白の測定、細胞内におけるイノシトールリン酸の分解活性の測定、プロスタグランジンE₂産

5 生の測定、トロンボキサンA₂の測定、cAMP（cyclic AMP）の測定、粘液産生量の測定、ムチンの産生量、ムチン（特にMuc5AC）のmRNA発現量、ムチン（特にMuc5AC）のプロモーターの転写活性、EGFレセプターシグナル伝達経路に関与する蛋白のチロシンリン酸化体の量（EGFRやMAPK（MAP kinase）などのリン酸化体の量）などである。

- 10 本発明の、測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによるPAR活性化作用に対する阻害活性スクリーニング方法において、PAR活性化のシグナル伝達の指標としては、すでに報告されている測定対象物を用いてASTによるPARのシグナル伝達系の活性化を測定することが可能である。

例えば、細胞内カルシウム流入や、細胞増殖アッセイ、NF κ B、AP-1などの転写エレメントを含む遺伝子（IL-8、IL-6、GM-CSFなど）の転写活性や生成蛋白の測定、細胞内におけるイノシトールリン酸の分解活性の測定、プロスタグランジンE₂産生の測定、トロンボキサンA₂の測定、cAMP（cyclic AMP）の測定、NO（Nitric Oxide）の生成を直接または間接に測定する方法、Xenopus Oocyteを用いたカルシウムの放出や電

20 流の測定、クロライドチャネルを介したクロライドイオントランスポート量の測定、粘液分泌量の測定などである。

また、AST発現細胞は、該酵素発現組換え細胞であることが好ましい。さらに、AST発現細胞もしくは該酵素発現組織としては、口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織由来であるか、またはそれ

25 らの組織に由来する細胞、器官または組織、もしくはそれらの細胞株が好ましい。かかる組織に由来する細胞もしくは細胞株には、癌細胞、癌細胞株が含まれる。特に上皮細胞、なかでも気道上皮細胞、ことに線毛上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する細胞株が好ましい。ほかに、AST発現細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由来の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由来の細胞株、漿液腺

30 細胞もしくは漿液腺細胞由来の細胞株などが挙げられる。

分泌を評価する細胞としては、粘液分泌細胞株であるNCI-H292が例示さ

れるが、口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織に存在する分泌能力を有する細胞、器官または組織、特に気道上皮細胞、なかでも線毛上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する細胞株が好ましい。かかる組織に由来する細胞もしくは細胞株には、癌細胞、癌細胞株が含まれる。
5 5. ほかに、分泌能力を有する細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由来の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由来の細胞株、漿液腺細胞もしくは漿液腺細胞由来の細胞株が好ましく挙げられる。細胞株として樹立されたNCI-H292細胞やA549細胞などが評価に供するには最も好ましい。

PAR発現細胞としては、PAR発現組換え昆虫細胞が例示されるが、口腔組織、
10 鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織に存在する細胞、器官または組織、特に気道上皮細胞、なかでも線毛上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する細胞株が好ましい。ほかに、PAR発現細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由来の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由来の細胞株、漿液腺細胞もしくは漿液腺細胞由来の細胞株、気道平滑筋細胞、肺線維芽細胞、
15 神経細胞などが好ましく挙げられる。細胞株として樹立されたBEAS-2Bなどが評価に供するには最も好ましい。

PARの具体例としては、ASTによって活性化されるプロテアーゼ活性化受容体であればよく、既知のPAR1、PAR2、PAR3、PAR4のなかではPAR1、PAR2が好ましく、上記4種のPARのなかではPAR-2が最も好ましい。
20

EGFR-L発現細胞としては、組換えEGFR-L発現動物細胞が例示されるが、口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織に存在する細胞、器官または組織、特に気道上皮細胞、なかでも線毛上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する細胞株が好ましい。ほかに、EGFR-L発現細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由来の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由来の細胞株、漿液腺細胞もしくは漿液腺細胞由来の細胞株、気道平滑筋細胞、肺線維芽細胞、神経細胞などが好ましく挙げられる。
25

具体的には細胞株として樹立されたHCl-H292、A549などである。評価に供するには組換えEGFR-L発現組換え昆虫細胞または動物細胞が好ましい。

30 EGFR-Lの具体例としては、ASTによって遊離するEGFR-Lであればよく、既知のEGF、HB-EGF、TGF- α 、Amphiregulin、B

etacellulinなどが挙げられる。なかでもEGF、HB-EGFが好ましく、EGFが最も好ましい。

EGFR発現細胞としては、NCI-H292細胞株が例示されるが、口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織に存在する細胞、器官または組織、特に気道上皮細胞、なかでも線毛上皮細胞、扁平上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する癌細胞または細胞株が好ましい。ほかに、EGFR発現細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由来の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由来の細胞株、漿液腺細胞もしくは漿液腺細胞由来の細胞株、気道平滑筋細胞、肺線維芽細胞、神経細胞もしくはそれら由来の細胞株などが好ましく挙げられる。最も好ましくは、細胞株として樹立されたHCl-H292、A549などである。

EGFR-Lの具体例としては、ASTによって遊離するEGFR-Lであればよく、既知のEGF、HB-EGF、TGF- α 、Amphiregulin、Betacellulinなどが挙げられる。なかでもEGF、HB-EGFが好ましく、EGFが最も好ましい。

本発明の哺乳類AST遺伝子由来のmRNAまたはcDNAとしては、マウスのものが例示される。例えば配列番号5または配列番号6で示されるASTをコードするmRNAまたはcDNAである。同様に、本発明の哺乳類のASTとしては、サル、ブタ、イヌ、ウサギ、ウシ、ハムスター、モルモットなどのものが例示され、具体的には配列番号27、29、31、33、35、37、39で示されるASTをコードするmRNAまたはcDNAが挙げられる。

本発明には、これらの核酸配列の全体もしくは一部の情報を用いて作製された本発明のASTの発現を指示する発現ベクター、それがトランスフェクトもしくはトランスフォームされた細胞、その細胞を培養し、培養液あるいは培養細胞から本発明の構造を有する活性ASTを回収することからなるASTの製造方法、さらにはその製造方法によって得られるASTが含まれる。さらに、本発明には天然哺乳類ASTが存在する哺乳類の体液、細胞、または細胞株から精製された天然哺乳類ASTも含まれる。

さらに本発明は、これらの核酸の全体もしくは一部の情報を用いて、それらの核酸に対応するAST遺伝子の発現量を検出する方法であるが、その検出手法としてはノーザンハイブリダイゼーション法、遺伝子増幅法が例示される。本発明には、

こうした遺伝子増幅法の実施に用いられる、天然哺乳類AST遺伝子配列の情報、例えばそのcDNA配列の情報に基づいて作製されたセンスプライマーまたはアンチセンスプライマーも含まれる。

- 5 本発明はさらに、上述のASTの活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与することからなる、ASTの活性を阻害、または該酵素の活性化を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法である。

- かかるASTの活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患としては、慢性気道炎症、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性
10 汎細気管支炎、気管支拡張症、喘息、副鼻腔気管支症候群、線維症、神経過敏症、凝固線溶系異常による疾患、癌、関節炎、または皮膚の炎症性の疾患が挙げられる。特に、呼吸器系における炎症性の疾患もしくは口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支、肺組織における分泌異常、細胞外基質合成異常、細胞増殖異常、細胞分化異常、神経系の異常、免疫系の異常、粘液線毛輸送系
15 の異常、または凝固線溶系異常による病態がもたらす疾患が例示される。

- かかるASTによる粘液産生亢進、炎症亢進、細胞内カルシウム流入惹起、EGFR経路活性化、PAR活性化により特徴づけられる疾患としては、慢性気道炎症、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、気管支拡張症、喘息、副鼻腔気管支症候群、線維症、神経過敏症、凝固線溶系異常による疾患、癌、
20 関節炎、または皮膚の炎症性の疾患が挙げられる。特に、呼吸器系における炎症性の疾患もしくは口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支、肺組織における分泌異常、細胞外基質合成異常、細胞増殖異常、細胞分化異常、神経系の異常、免疫系の異常、粘液線毛輸送系の異常、または凝固線溶系異常による病態がもたらす疾患が例示される。

- 25 また、本発明は上述した本発明の核酸の一部を用いて作製されたアンチセンスオリゴヌクレオチドであるが、本発明には上述のASTの活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対し、かかるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する薬剤を投与することにより、ASTの活性阻害またはその活性化阻害による治療効果を判定する方法、ならびにかかるアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する該疾患の治療薬も含まれる。このよう
30 なASTの活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患の具

体例としても、上述したものと同一疾患が例示される。

本発明の実施例13、14においてはNCI-H292細胞株を用いてASTの
粘液産生亢進作用の評価を行っているが、AST阻害剤の粘液産生亢進阻害スクリ
ーニング系に用いる細胞としては、分泌能を有する細胞が望ましく、呼吸器系にお
ける分泌能を有する細胞、器官または組織がより好ましい。細胞株として樹立され
たNCI-H292細胞やA549細胞などが評価に供するには最も好ましい。

指標となる分泌物としては、有機物、無機物があるが、有機物としては糖タンパ
クが好ましく、より好ましくは粘液であり、この構成成分であるムチンが分泌指標
として病態との関連から最も好ましい (Tsuda, T. et al., 「呼吸器疾患の分子生物
学」: 87-92, 1998)。さらにムチンのなかでもCOPDなどの過分泌の病態におい
て注目されているMuc5AC (Meerzaman, D. et al., J. Biol. Chem., 269: 12
932-12939, 1994)、Muc2 (Gum, J. R. Jr. et al., J. Biol. Chem., 269
(4): 2440-2446, 1994) などが特に好ましい。

粘液産生亢進作用に基づくHAST阻害剤スクリーニング系における測定指標の
実施形態としては、(1)糖蛋白レベルでは、ムチン抗原に対する抗体であるモノ
クローナル抗体17Q2 (ヒト気道ムチンを抗原とする) (Thomas, E. et al., Am.
J. Respir. Cell Mol. Biol., 14: 104-112, 1996) などによる酵素免疫測定法や、
実施例13で示される粘液染色法 (AB-PAS染色) および高分子硫酸ラベル体
の放出量の測定などが好ましく挙げられる。(2)遺伝子レベルでは、ムチン (M
uc5AC、Muc2が好ましい) のmRNA量を測定する方法として、実施例1
4で開示されているリアルタイムPCR法や、遺伝子の転写活性を評価する方法と
してムチンのプロモーター領域を利用したレポータージーンアッセイ系などが好ま
しく挙げられる。

また、実施例14により示されるようにHAST活性に基づくMuc5ACのm
RNA量の上昇がEGF-R中和抗体によりブロックされることから、EGF-R
経路のシグナル伝達がASTによる粘液産生亢進の主たる経路 (Takeyama, K. et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 3081-3086, 1999) のひとつになりうるこ
とが推定され、このEGF-Rのシグナル伝達経路に関与する反応 (Louis, M. L. et
al., Current Opinion in Cell Biology, 11: 177-183, 1999) を定量化すること
により、AST阻害剤の効果を測定することが可能である。上記に関連する経路に
おいて定量化ができるものであれば、すべて測定指標として使用できる可能性があ

る。たとえば、ターゲット細胞におけるEGF-Rのチロシン残基のリン酸化やMAPK (mitogen-activated protein kinase) のリン酸化などを免疫測定法を用いて指標とすることができる。

- 粘液産生亢進作用に基づくAST阻害剤スクリーニング系の実施形態としては、
- 5 粘液分泌能を有する組織、器官または培養細胞に対してASTを添加し、そこに化合物などを加えて分泌物の量、mRNA量または該遺伝子の転写活性などを測定することにより、粘液産生阻害効果を測定する方法が挙げられる。また、上記したように、器官または細胞培養上清中のEGFR-Lの含有量を直接測定する方法、または間接的に他の細胞系に添加して測定する方法などによっても阻害効果を判定する
- 10 ことができる。測定対象となるEGFR-Lとしては、EGF (Epidermal Growth Factor, Carpenter, G. et al., J. Biol. Chem., 265: 7709-7712, 1990)、HB-EGF (Heparin-binding EGF-like Growth Factor, Abraham, J. A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 190: 125-133, 1993)、TGF- α (Transforming Growth Factor - α , Lee, D. C. et al., Pharm. Rev., 47: 51-85, 1995)、A
- 15 mp hiregulin (Plowman, G. D. et al., Mol. Cell. Biol., 10: 1969-1981, 1990)、Betacellulin (Shing, Y. et al., Science, 259: 1604-1607, 1993)などが好ましく挙げられる (Gerhard, R. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1333: F179-F199, 1997)。特にEGF、HB-EGFが好ましい。

20 実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるものではない。

[実施例1] ASTの調製

- 25 喀痰中からの活性型天然ASTの精製は、以下に述べる組換えASTを精製した方法と同様の方法により実施した。

- 組換えHATの精製に関しては、特開平8-89246号公報、US-5804410、EP-699763およびYamaoka K. et al., J. Biol. Chem., 273 (19): 11895-11901, 1998に開示されているcDNA配列に基づいて組換えバキュロウイルスベクターを調製し、昆虫細胞に感染させることにより組換えAST (rAST)
- 30 T) を産生させ、その細胞画分よりrASTを精製した。すなわち、昆虫細胞 (T

n-5細胞)を単層で 5×10^6 個/mLの密度まで生育させ、培地を除去した後、細胞あたりMOI (Multiplicity of Infection) = 0.2-0.5になるように組換えAST発現バキュロウイルスを含む無血清培地を加えて感染させ、3日間培養し、ASTを発現させた。発現した蛋白質の確認は、SDS-PAGEおよび抗ASTペプチド抗体を用いたウエスタンブロット法 (Anal. Biochem., 112, 195-203, 1981) によって行った。

遠心分離 (約500×g) で上清と細胞を分離した。450 mLに相当する細胞をM-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent、PIERCE社製) 100 mLに懸濁し、室温で30分インキュベートした。さらに超音波破碎を15分間氷上で行い、可溶化した。得られた可溶化物を10000 rpm、4℃で30分間遠心し、上清を回収した。回収した上清を1リットルの50 mM 酢酸ナトリウム (pH4) / 0.01% PEG6000にて室温で2時間攪拌しながら透析したのち、4℃、10000 rpmで30分間遠心して上清を回収した。

次にこの試料にBSAを添加し (終濃度100 μg/mL)、2リットルの50 mM Tris-HCl (pH8) / 0.5 M NaCl / 0.01% PEG6000にて2回透析した後、4℃で10000 rpm、30分間遠心して上清を回収した。回収した上清をベンザミジンセファロース6B (10 mLベッドボリューム) にのせ、100 mLの50 mM Tris-HCl (pH8) / 0.5 M NaCl / 0.01% PEG6000にてカラムを洗浄した。さらに80 mLの10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) にてカラムを洗浄したのち、10 mM HCl (pH2) にて結合蛋白を溶出した。溶出後、各フラクションについて吸光度 (280 nm) を測定し、メインピークを集めた。そしてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行って分子量約30 kDの蛋白質を検出、確認し、これを精製rAST標品として凍結保存した。

25

[実施例2] ASTの活性測定

トリプシン用合成基質Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (MCA: メチルクマリナムイド) を100 μM、BSAを0.01%含有する50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.6) 1.0 mLにAST含有溶液を50 μL加え、37℃で1時間インキュベートした。次いで1 mLの30% 酢酸を加え、生成した7-アミノ-4-メチルクマリナム (AMC) 量を蛍光測定により定量し (蛍光460

30

nm、励起光380 nm)、酵素活性を算出した。1分間に1 pMのAMCを生成させる活性を1単位と定義する。

[実施例3] 組換えASTおよび天然ASTのアミノ酸配列の決定

- 5 実施例1で得られた精製蛋白につき、還元および非還元条件下でSDS-PAGEを行った。電気泳動後のゲル中の蛋白をPVDF (polyvinylidene disulfide) 膜 (イモビロン-P-トランスファー膜、Millipore社) にトランスファーした後、クマシーブルーR-250溶液 (0.1%の50%メタノール溶液) 中で染色し、約30 kD付近のAST蛋白のバンドを切り出し、そのアミノ酸配列を
10 決定した。

その結果、昆虫細胞発現組換えASTに関しては、還元条件下では、I-L-G-Gからはじまるアミノ酸配列が確認された。非還元条件下では、3種類のバンドを確認することができた。分子量の大きいものからそれぞれ (a)、(b)、

- (c) とすると、銀染色により推定された蛋白量としては (a) 8%、(b) 8
15 7%、(c) 5%の含有率であった。それぞれのバンドを切り出して決定されたアミノ酸配列は、

(a) N-S-G-N-L-E-I-N および I-L-G-G-T-E-A-E
それぞれ等モル

- (b) D-Q-A-A-A-N-W-L および I-L-G-G-T-E-A-E
20 それぞれ等モル

(c) I-L-G-G-T-E-A-E

からはじまるアミノ酸配列であった。以前、報告されているASTは (c) の構造を有する蛋白である。

- 以上のことから、精製されたrASTは、メインバンド (87%) が (b) の構造であり、D-Q-A-A-A-N-W-LからはじまるプロペプチドとI-L-G-G-G-T-E-A-Eからはじまるトリプシン様蛋白部分とがジスルフィド結合
25 している構造物が主体であることが明らかとなった。この構造物が活性を有するものである。

- 一方、喀痰から精製したASTに関しては、還元条件下では、既報のI-L-G-G
30 -Gから始まるアミノ酸配列が確認された。一方、非還元条件下ではI-L-G-Gのほかにそれぞれアミノ酸のピークを確認することができ、その配列は、I-N

- E—Blank—G—A—G—Pと読み取れた（最初のIに関してはメインピークと同一）。この配列は、プロペプチドの170番目のIから始まるヒトASTのアミノ酸配列と一致し、組換えASTと同様に喀痰由来の天然ASTもプロペプチドとジスルフィド結合している構造が主体であることが初めて明らかとなった。
- 5 スルフィド結合のプロペプチド（軽鎖）側のシステインは173番目のシステインであり、トリプシン様酵素部分（重鎖）は他のトリプシン類との構造の相同性比較より292番目のシステインに相当するシステイン部分でジスルフィド結合によって連結されている構造であることが判明した。

10 【実施例4】各種組換えヒトPAR発現細胞の調製

(1) PAR cDNAの取得とPAR cDNA含有トランスファーベクターの作製

- 正常ヒト気道上皮細胞よりRNAを抽出し、cDNA合成キット（アマシャムファルマシア バイオテック社製）を用いてcDNAを合成し、プライマーPAR1F（配列番号7）およびPAR1R（配列番号8）によりPAR-1を、プライマ
- 15 ーPAR2F（配列番号9）およびPAR2R（配列番号10）によりPAR-2を、プライマーPAR3F（配列番号11）およびPAR3R（配列番号12）によりPAR-3をPCR増幅した。また、ヒト前立腺由来cDNA（Clontechより購入）の1/100量を用いてプライマーPAR4F（配列番号13）およびPAR4R（配列番号14）によりPAR-4をPCR増幅した。そのPCR
- 20 反応液をアガロースゲル電気泳動した結果、PAR-1ないしPAR-4のcDNAフラグメントのバンドが認められた。このDNAフラグメントをDNA精製キット（QIAGEN社製QIAEXII使用）を用いてゲルから抽出、精製した。精製したDNAフラグメントをEcoRI、BamHI（PAR4に関してはBglI
- 25 I）で切断し、パキユロウイルストランスファーベクターpVL1393（Invitrogen社）を制限酵素EcoRIおよびBamHIで切断したものとライゲーション反応を行った。この反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、いくつかの形質転換体のコロニーからプラスミドを抽出し、数クローンについてプラスミド精製（QIAGEN社製プラスミド抽出キット使用）を行った。これらの精製プラスミドを用いてABI社製蛍光自動シーケンサーによりDNA配列を決定し
- 30 た結果、これらDNAフラグメントがPARをコードしていることが明らかになった。

(2) PAR発現用組換えバキュロウイルスの作製

組換えバキュロウイルスの作製にはファーマジェン社製のBaculoGoldTM トランスフェクションキットを用いた。昆虫細胞Sf9を 1×10^6 細胞/mLで35mmディッシュに播種し、30分間室温にて接着させた。一方、0.5mgのBaculoGoldTM DNAと2 μ gのpVL-PARプラスミドDNAを混ぜ、室温に5分間静置し、その後、0.5mLトランスフェクションバッファーB (25mM HEPES, pH7.1, 125mM CaCl₂, 140mM NaCl)を加えてよく混ぜた。次に播種したSf9細胞の培地を抜き取り、0.5mLのトランスフェクションバッファーA (グレース培地、10% 牛血清含有)を加えた。ここに、トランスフェクションバッファーBとDNAの溶液を少しずつ滴下していくことにより、コトランスフェクションを行った。27℃でインキュベーションし、4時間後に新しいグレース培地 (10% 牛血清含有) に取り換えた。5日後、組換えウイルスを含む培養上清を回収し、培養上清100 μ LとEX-CELL 405培地200 μ Lを調製し、Sf9細胞 (1×10^6 細胞/ディッシュ) に室温で1時間感染させた。上清を抜き取り、1% SeaPlaqueアガロース含有グレース培地 (42℃) を2mL滴下して加え、アガロースが固まるまで10分間室温に放置した。その後、27℃で5日間培養した。5日目にニュートラルレッド/PBS (Phosphate Buffered Saline) (0.1g/L) を1mL/ディッシュ加えた。6日目にウイルスプラークを観察し、プラークを確認した。数個のシングルウイルスプラークをアガロースごとパスツールピペットで抜き取り、グレース培地と混ぜてウイルスを培地中に拡散させた。このシングルプラーク由来のウイルス液を単層培養したSf9細胞 (25cm² フラスコ培養) に感染させた。これを27℃で5日間培養してウイルス液を回収した。このウイルス液を1mLとって1.5mLエッペンドルフチューブに入れ、4℃、15000回転/分で30分間遠心し、ウイルス粒子を沈殿させた。沈殿物を200 μ LのTE (10mM Tris, 0.1mM EDTA) 緩衝液に懸濁し、50 μ LのLysis 緩衝液 (10% SDS, 1mM EDTA) を加え、60℃で20分間インキュベートした。さらにフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により反応液中のウイルスDNAを回収した。回収したウイルスDNAの1/10を使用し、プライマーBacF (配列番号15) およびBacR (配列番号16) によってPCR増幅を行い、DNA中にPARcDNAが含有されていることを確認し

た。このPAR発現用組換えバキュロウイルスをVL-PARと命名した。ウイルス液は適宜希釈してブランクアッセイを行い、タイターをチェックした。さらに、ウイルス液をSf9細胞に感染させることで $1-5 \times 10^7$ pfu (plaque forming unit) /mL程度の高濃度のウイルス液を得た。ウイルス液は4℃および-8

5 0℃で保存した。

(3) 組換えバキュロウイルスによるPARの昆虫細胞における発現

上記のようにして得られたPAR発現用組換えバキュロウイルスVL-PARを、75 cm² フラスコに播種した 1.0×10^7 のSf9細胞にMOI=2で感染させ、40時間、27℃で静置培養した。培養後、感染細胞を回収し、カルシウム流入実験によってPARの機能を有することの確認を行った。

[実施例5] PAR発現昆虫細胞を用いたヒトASTによるカルシウム流入評価

回収した感染細胞(約 5×10^6 細胞)をHEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺ (-) pH7.4で1回洗浄した後、5mLのHEPES-Tyrode緩衝液(1μg/mL、Fura2-AM含有)に懸濁してFura2-AMを27℃で30分間負荷した。800 rpmで5分間、室温で遠心して細胞を回収し、HEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺ (-) pH7.4で2回洗浄した後、5mLのHEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺ (-) pH7.4に再懸濁した。この細胞懸濁液に5μLの1M CaCl₂を加えて最終濃度1mM CaCl₂になるようにし、遮光して室温で5分間インキュベートした。このように調製したFura2-AM負荷感染細胞を96ウェルプレートに100μL/ウェルで分注し、さらにHEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺ (+) pH7.4を80μL/ウェルで分注し、Fluorescence Drug Screening System (浜松ホトニクス)で測定した。すなわち、[励起光340nmによる500nmの蛍光強度] / [励起光380nmによる500nmの蛍光強度] (細胞内カルシウム濃度を反映)を測定した。

AST (0.2~2単位/mL)、トリプシン(牛の膵臓由来、0.1~10単位/mL)、ヒトトロニン(0.1~10単位/mL)、もしくはSFLLRNamide (PAR-1、2のアゴニストペプチド)、もしくはSLIGRL (PAR-2のアゴニストペプチド、10~100μM)を添加して刺激を与え、細胞内カルシウム濃度を経時的に測定した。その結果、PAR発現用組換えバキュロ

イルスを感染させた昆虫細胞に特異的にカルシウム流入が観察された。この結果から、機能を有するPARが昆虫細胞に発現していることが証明された。

PAR-1~PAR-4それぞれの Ca^{2+} 流入は以下に示す。

5 PAR-1は、AST (2単位/mL)、トリプシン (0.1~10単位/mL)、トロンピン (0.1~10単位/mL)、SFLLRNamide (10~100 μ M) で Ca^{2+} 流入が認められた。

PAR-2は、AST (2単位/mL)、トリプシン (0.1~10単位/mL)、トロンピン (1~10単位/mL)、SFLLRNamide (10~100 mM)、SLIGRL (10~100 μ M) で Ca^{2+} 流入が認められた。

10 PAR-4は、AST (2単位/mL)、トリプシン (0.1~10単位/mL)、トロンピン (0.1~10単位/mL) で Ca^{2+} 流入が認められた (図12参照)。

[実施例6] 気道上皮細胞を用いたASTによるカルシウム流入実験

15 (1) 正常ヒト気道上皮細胞を用いたASTによるカルシウム流入実験

3枚の10 cmディッシュにコンフルエントになった正常ヒト気道上皮細胞 (BioWhittaker社より購入) を用い、ASTによる Ca^{2+} 流入を検討した。10 mM EDTA/Hepes-Tyrode緩衝液で10分間かけて細胞を剥がし、室温で800 rpm、5分間遠心して細胞を回収し、5 mLのHEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} (-) pH7.4に再懸濁した。回収した細胞 (約 1.2×10^6 細胞) を5 mLのHEPES-Tyrode緩衝液 (1 μ g/mL、Fura2-AM含有) に懸濁し、Fura2-AMを37℃で1時間負荷した。室温で800 rpm、5分間遠心して細胞を回収し、HEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} (-) pH7.4で2回洗浄した後、1.3 mLのHEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} (-) pH7.4に再懸濁した。この細胞懸濁液に5 μ Lの1 M $CaCl_2$ を加えて最終濃度1 mM $CaCl_2$ になるようにし、遮光して室温で5分間インキュベートした。このように調製したFura2-AM負荷感染細胞を96ウェルプレートに100 μ L/ウェルで分注し、さらにHEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} (+) pH7.4を80 μ L/ウェルで分注して、Fluorescence Drug Screening System (浜松ホトニクス) で測定した。すなわち [励起光340 nmによる500 nmの蛍光強度] /

20
25
30

〔励起光380 nmによる500 nmの蛍光強度〕（細胞内カルシウム濃度を反映）を測定した。

AST（2単位/mL）、牛の膵臓由来トリプシン（1～100単位/mL）、ヒトトロニン（1～100単位/mL）、SFLLRNamide、もしくはSLIGRL（10～100 μ M）を添加して刺激を与え、細胞内カルシウム濃度を経時的に測定した。

その結果、AST（2単位/mL）、トリプシン（10～100単位/mL）、SFLLRNamide（10.0 μ M）で Ca^{2+} 流入が認められた（図13参照）。

（2）気道上皮細胞株を用いたASTによるカルシウム流入実験

10 気道上皮細胞株BEAS-2BについてのASTによる Ca^{2+} 流入を検討した。
6枚の10 cmディッシュにコンフルエントになった細胞を用いた。10 mM EDTA/Hepes-Tyrode緩衝液で10分間かけて細胞を剥がし、室温で1500 rpm、5分間遠心して細胞を回収し、10 mLのHEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} （-）pH7.4に再懸濁した。回収した細胞（約 1.1×10^7 細胞）を、11 mLのHEPES-Tyrode緩衝液（1 μ g/mL、Fura 2-AM含有）に懸濁し、Fura 2-AMを37℃で30分間負荷した。室温で1500 rpm、5分間遠心して細胞を回収し、HEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} （-）pH7.4で2回洗浄した後、11 mLのHEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} （-）pH7.4に再懸濁した。この細胞懸濁液に11 mLの10 M $CaCl_2$ を加えて最終濃度1 mM $CaCl_2$ になるようにし、遮光して室温で5分間インキュベートした。このように調製したFura 2-AM負荷感染細胞を96ウェルプレートに100 μ L/ウェルで分注し、さらにHEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} （+）pH7.4を80 μ L/ウェルで分注し、Fluorescence Drug Screening System（浜松ホトニクス）
25 で測定した。すなわち〔励起光340 nmによる500 nmの蛍光強度〕／〔励起光380 nmによる500 nmの蛍光強度〕（細胞内カルシウム濃度を反映）を測定した。

AST（0.2～2単位/mL）、牛の膵臓由来トリプシン（0.1～100単位/mL）、ヒトトロニン（0.1～100単位/mL）、もしくはSFLLRNamide、SLIGRL（PARアゴニストペプチド、10～100 μ M）を
30 添加して刺激を与え、細胞内カルシウム濃度を経時的に測定した。

その結果、AST (2単位/mL)、トリプシン (10~100単位/mL)、SFLLRNamide (100 μ M) でCa²⁺流入が認められた (図14参照)。

[実施例7] HASTによる気道上皮細胞株 (BEAS-2B) からのIL-8遊離

5 1) 細胞

BEAS-2B (気道上皮細胞株、ATCCより購入) を用いて試験を実施した。通常の培養はLHC-9 (Biofluid社製) を用いて行った。試験に供する際にはLHC-8 (ヒドロコルチゾンなし、Biofluid社製) に懸濁して5.0 $\times 10^4$ cells/cm²の密度でコラーゲン (Collagen社製) /BSA (ベーリンガーマンハイム社製) /フィブロネクチン (シグマ社製) でコートした96ウェルプレート (Falcon社製) に播きこんだ。24時間培養後、細胞が正常に生着しているのを確認してから薬剤処理を行った。

2) 薬剤処理

HAST (100mU/mL) およびTNF- α (R&D社製) (1 mg/mL) をLHC-8 (ヒドロコルチゾンなし) 中で、所定の濃度のベンザミジンもしくはロイペプチンと氷上で30分間反応させた。37℃に加温した後、ウェル中の細胞培養液と全交換して処理を開始した。24時間培養後に培養上清を回収し、IL-8産生の測定を行うまで-80℃で保存した。

3) IL-8濃度測定

20 培養上清中のIL-8濃度は市販の抗体を用いたサンドイッチELISA法により測定した。96ウェルEIA用プレート (Maxi Sorp、Nunc社製) にPBSで1 μ g/mLに調整したMouse MAb Anti-Human IL-8 Capture (バイオソース社製) を50 μ L/ウェルで添加し、4℃で一晩放置して抗体を固相化した。250 μ L/ウェルの洗浄緩衝液 (0.05% Tween20 (BioRad社製) 含有PBS) で5回洗浄した後、250 μ L/ウェルのブロッキング緩衝液 (1%BSA (ベーリンガーマンハイム社製)、0.05%アジ化ナトリウム含有PBS) を添加し、4℃で一晩放置してブロッキングを行った。250 μ L/ウェルの洗浄緩衝液で5回洗浄した後、ブロッキング緩衝液で50倍に希釈した培養上清、もしくはブロッキング緩衝液で調製したIL-8スタンダードを50 μ L/ウェルで添加し、室温で1時間反応させた。250 μ L/ウェルの洗浄緩衝液で5回洗浄した後、希釈緩衝液 (1%BSA、0.

0.5% Tween 20 含有 PBS) で $0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した Mouse
MAb Anti-Human IL-8 biotin (バイオソース社製) を
 $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ で添加し、室温で1時間反応させた。 $250 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ の洗浄
緩衝液で5回洗浄した後、希釈緩衝液で6000倍に希釈したHRP-ストレプト
5 アビジン (Genzyme社製) を $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ で添加し、15分間反応させ
た。 $250 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ の洗浄緩衝液で5回洗浄した後、TMB Microwe
11 ペルオキシダーゼ基質 (KPL社製) を $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ で添加し、約15
分間発色させた。1Mの硫酸を $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ で添加し、発色反応を停止させ
た後、直ちに ThermoMax マイクロプレートリーダー (Molecular
10 Devices社製) で 450 nm の吸光度を測定した。各サンプルでの吸光度
を、スタンダードの吸光度より作成した標準曲線に回帰させてサンプル中のIL-
8濃度を算出した。結果を図8に示す。この結果、プロテアーゼ阻害剤でHAST
の活性を抑制することにより、HASTによって惹起される気道上皮細胞からのIL-
8遊離が抑制されることが示された。

15

【実施例8】 HASTによるIL-8プロモーターの転写活性化IL-8プロモ-
ーター領域のクローニング

1) IL-8プロモーター領域のクローニング

ヒトゲノムDNAを鋳型として、フォワードプライマー: IL8-1481; C
20 CCAGATCTGAATTTCAGTAACCCAGGCATTATTTTATC、
フォワードプライマー: IL8-162; AACTTTGGATCCACTCCG
TATTTGATAAGG、リバースプライマー: IL8LUC-R; CATGT
TTACACACAGTGAGAATGGTTCCTTCCを用いてLA-PCR
(宝酒造社製) によりIL-8のプロモーター領域 (Mukaida N. et al., J. Immuno
25 l., 143: 1366-1371, 1989) の約1.5 Kb、162 bpをそれぞれクローニングした。
PCRサイクルは、 98°C 20秒、 58°C 1分、 68°C 5分を25サイクル行なっ
た。得られた約1.5 Kb、約0.25 Kbのプロモーター領域のDNAフラグメン
トをそれぞれIL8-1481、IL8-162と名付けた。

2) IL-8レポータープラスミドの構築

30 pGL3-Basic (Promega社製) ベクターのルシフェラーゼ遺伝子
中のATG (翻訳開始コドン) からNar I サイトまでを含むDNAフラグメント

をフォワードプライマー：IL8LUC-F；CTGTGTGTAAACATGG
AAGACGCCAAAAACATAAA、リバースプライマー：LUC2087
R；CGGGAGGTAGATGAGATGTGを用いてPCR法により増幅した。
このルシフェラーゼ遺伝子N末端DNAフラグメントとIL8-1481、IL8
5 -162とをPCR法により連結し、PCRフラグメントIL8-1481-Lu
c（約2Kb）、IL8-162-Luc（約800bp）を得た。これらをBa
mHIおよびNarIで切断し、それぞれpGL3-BasicのBglII、Na
rIサイトでルシフェラーゼ遺伝子の5'に挿入し、レポータープラスミドpGL
-IL8-1418、pGL3-IL8-162を構築した。

10 3) 細胞

BEAS-2B（気道上皮細胞株、ATCCより購入）を用いて試験を実施した。
通常の培養はLHC-9（Biofluid社製）を用いて行った。試験に供する
際にはLHC-8（ヒドロコルチゾンなし、Biofluid社製）に懸濁して2.
0×10⁴ cells/cm²の密度でコラーゲン（Collagen社製）/BS
15 A（ベリンガーマンハイム社製）/フィブロネクチン（シグマ社製）でコートし
た96ウェルプレート（Falcon社製）に播きこんだ。24時間培養後、細胞
が正常に生着しているのを確認してから一過性の遺伝子導入を行った。

4) 一過性の遺伝子導入

一過性の遺伝子導入はLipofectAmine PLUS試薬（Gibco
20 社製）を用いて行った。96ウェルプレート中の培養液を50μLの新鮮なLHC
-8（ヒドロコルチゾンなし、Biofluid社製）に置換した。20μLのL
HC-8（ヒドロコルチゾンなし、Biofluid社製）中にコントロールプラ
スミドを0.01μg、レポータープラスミド（pGL3-Basicもしくはp
GL3-IL8-1481もしくはpGL3-IL8-162）を0.09μg、
25 LipofectAmine試薬（Gibco社製）を0.5μLおよびPLUS
試薬（Gibco社製）を0.5μL含有するトランスフェクション培地を1ウェ
ルあたり20μL添加して遺伝子導入を開始した。以降48時間、CO₂インキュ
ベーター内で培養した。

5) 薬剤処理

30 遺伝子導入を開始して48時間後に薬剤処理を行った。ウェル中の培養液をHA
ST（300mU/mL）もしくはTNF-α（R&D社製）（1ng/mL）を

含むLHC-8（ヒドロコルチゾンなし、Biofluid社製）に置換して3時間培養した。後培養液を除去し、細胞を1回PBSで洗浄した後、ルシフェラーゼ活性測定に供した。

6) ルシフェラーゼ活性測定

- 5 ルシフェラーゼ活性はピッカジーンデュアル・シーパンジー（東洋インキ社製）を用いて測定した。HASTもしくはTNF- α で3時間処理した後、培養液を除去し、PBSで1回洗浄した後、20 μ Lの細胞溶解剤を添加して室温で15分間溶解させた。細胞溶解液を1.5 mLのマイクロチューブに回収し、4℃で15000回転、10分間遠心して上清をサンプルとして採取した。サンプル20 μ Lを黒色96ウェルプレート（住友ベークライト社製）に添加し、はじめに100 μ Lのピッカジーン発色試薬IIを添加してホタルルシフェラーゼによる発光をルミノメータ（LUMINOUS CT-9000D（DIA-IATRON社製））で測定した。引き続き100 μ Lのシーパンジー発光試薬を添加し、シーパンジールシフエラーゼによる発光をルミノメータ（LUMINOUS CT-9000D（DIA-IATRON社製））により測定した。得られたホタルルシフェラーゼ活性をシーパンジールシフエラーゼ活性で除する補正をしてレポーター活性とした（Relative Light Unit (R. L. U.)）とした。さらに各サンプルでのレポーター活性を無刺激群での平均値に対する増加倍率としてデータを解析した。結果を図9に示す。この結果から、HASTは転写レベルでIL-8の産生を亢進させることが明らかとなった。
- 10
15
20

【実施例9】 マウスASTカウンターパート cDNAの取得

(1) マウス気道cDNAの取得

- マウス（C57Black）の気道を採取し、ひとつの気道あたり1 mLのISOGENを使用し、ホモジェナイズを行った。このホモジェネートに0.2 mLのクロロホルムを加え、ボルテックスで混和し、室温で2～3分間放置した。4℃、12000 rpmで10分間遠心し、上層を新しいチューブに移した。これに0.5 mLのイソプロピルアルコールを加え、混合し、室温で10分間放置した。これを15000 rpm、4℃で15分間遠心して全RNAを沈殿させた。ペレットに75% エタノールを1 mL加え、よく混和した後、4℃、10000 rpmで5分間遠心した。ペレットを風乾し、DNase/RNaseフリーの水に溶解し、一
- 25
30

80℃で保存した。

マウス気道由来の全RNA 2.5 μ gおよびオリゴ(dT)₁₂₋₁₈を用い、SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit (GIBCO
5 O-BRL社製)を使用し、添付のプロトコールに従ってcDNAの合成を行った。

(2) マウス気道cDNAからのAST PCRフラグメントの取得

ヒトASTおよびマウスヘプシン(Hep sin)の塩基配列の相同性を比較し、配列番号17、配列番号18で示されるフォワードプライマーおよびリバースプライマーを作成した。このプライマーを使用し、TaKaRa Taq™ ポリメラーゼ(宝酒造製)を用い、マウス気道由来cDNAを鋳型として添付のプロトコールに従ってPCR反応を行った。PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った結果、
10 目的とする450bp付近に増幅バンドを認めた。この増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、TAクローニングベクターに挿入し、大腸菌に形質転換してクローンを得た。プラスミドを定法に従って調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列決定を行った。その結果、マウスHep sinのほかに、ヒトASTと相同性を示す遺伝子がクローニングされていることが明らかとなった。

(3) 5'-RACE、3'-RACEによる全長マウスAST cDNAの取得

(2)によって得られた部分塩基配列をもとに5'-RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)および3'-RACE用のプライマーを合成した。1st RACE用のプライマー配列は配列番号19、配列番号20を用い、2nd RACE用のプライマー配列は配列番号21、配列番号22に示す。この配列をもとにしてMouse 15-day Embryo Marathon-Ready™ cDNA(Clontech社製、Swiss-Webster/NIH embryo)を用い、5'-RACEおよび3'-RACEを施行した。PCR反応はAdvantage 2 Polymerase Mix(Clontech社製)を用い、添付のプロトコールに従って行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動を行った結果、5'-RACEによって約1.1 kbpの増幅フラグメントが、3'-RACEによって約0.6 kbpの増幅フラグメントが得られた。この増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、
25 TAクローニングベクターに挿入し、大腸菌に形質転換してそれぞれ数クローンを得た。これらの形質転換体よりプラスミドを定法に従って調製し、挿入DNAフラ

30

グメントの塩基配列を決定した。その結果、(2)によって得られた部分塩基配列と一致したシーケンスから始まり、5' - 方向、3' - 方向にヒトASTと相同性のある塩基配列が伸張されていることが確認された。決定された完全長のマウスAST cDNA配列およびアミノ酸配列を配列番号4に示す。

- 5 さらに実際にマウス気道において存在するマウスASTが同様のアミノ酸配列であるか否かを確認するため、アミノ酸をコードする遺伝子の外側を認識するPCRプライマー（配列番号23および配列番号24）を合成した。Advantage 2 Polymerase（Clontech社製）を用いてマウス気道cDNAのPCR反応を行い、増幅したDNAフラグメントの塩基配列決定を行った。その結果、アミノ酸配列が一致することが判明し、気道由来のマウスAST cDNA（配列番号6）のクローニングに成功した。

(4) ヒトASTとのホモロジーの比較

- ヒトASTとマウスASTとのアミノ酸の相同性を比較した結果を図11に示した。相同性比較は遺伝子解析ソフト（Gene Works；テイジンシステムテクノロジー社）を用いて行った。アミノ酸配列は全体で66%一致していた。

[実施例10] げっ歯類ASTカウンターパート cDNAの取得

(1) げっ歯類気道cDNAの合成

- ハムスター、モルモットの気道を採取し、気道約0.5グラムあたり5mLのISOGENを使用し、ホモジェナイズを行った。このホモジェネートを3000rpmで10分間遠心し、上清を1mL採取した。この上清に0.2mLのクロロホルムを加え、ボルテックスで混和し、室温で2~3分間放置した。12000rpmで10分間、4℃で遠心し、上層を新しいチューブに移した。これに0.5mLのイソプロピルアルコールを加え、混合し、室温で10分間放置した。これを15000rpm、4℃で15分間遠心して全RNAを沈殿させた。ペレットに75%エタノールを1mL加え、よく混和した後、10000rpmで5分間、4℃で遠沈した。ペレットを風乾し、DNase、RNaseフリーの水に溶解し、-80℃で保存した。

- 上記で得られた気道由来のtotal RNA 2.5μgおよびオリゴ(dT)₁₂₋₁₈を用い、SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis

sis Kit (GIBCO-BRL社製) を使用し、添付のプロトコールに従ってcDNAの合成を行った。

(2) cDNAからのAST-PCRフラグメントの取得

ヒトASTおよびマウスヘプシン (Hepsin) の塩基配列の相同性を比較し、
5 配列番号17、配列番号18で示されるフォワードプライマーおよびリバースプライマーを作成した。このプライマーを使用し、TaKaRa Taq™ ポリメラーゼ (宝酒造製) を用い、気道由来cDNAを鋳型として、添付のプロトコールに従ってPCR反応を行った。PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った結果、目的とする450bp付近に増幅バンドを認めた。この増幅DNAフラグメントをアガ
10 ロースゲルより切り出し、TAクローニングベクターに挿入し、大腸菌に形質転換してクローンを得た。プラスミドを定法に従って調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列決定を行った。その結果、ヒトASTと相同性を示す遺伝子がクローニングされていることが明らかとなった。

(3) 5'-RACE、3'-RACEによる全長げっ歯類AST cDNAの取得

15 (2) によって得られた部分塩基配列をもとに5'-RACEおよび3'-RACE用のプライマーを合成した。一方、気道から採取したTotal RNAを1μg使用して、SMART-RACE Kit (Clontech社製) を用いて5'-RACE、3'-RACE用cDNAを合成し、5'-RACEおよび3'-RACEを施行した。PCR反応はAdvantage 2 Polymerase Mix (Clontech社製) を用い、添付のプロトコールに従って行
20 った。5'-RACE、3'-RACEによって得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、メインの増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、TAクローニングベクター (Invitrogen社製) に挿入し、大腸菌に形質転換してそれぞれ数クローンを得た。これらの形質転換体よりプラスミドを定法に
25 従って調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列を決定した。その結果、(2) によって得られた部分塩基配列と一致したシーケンスから始まり、5'-方向、3'-方向にヒトASTと相同性のある塩基配列が伸張されていることが確認された。決定された完全長のげっ歯類AST cDNA配列およびアミノ酸配列を示す。
モルモット：配列番号36および37、ハムスター：配列番号38および39。

30

[実施例11] 哺乳類ASTカウンターパート cDNAの取得

(1) 哺乳類気道cDNAの取得

ウサギ、イヌ、ブタ、ウシ、カニクイザルの気道を採取し、気道約0.5グラムあたり5mLのISOGENを使用し、ホモジェナイズを行った。このホモジェナートを3000rpmで10分間遠心し、上清を1mL採取した。この上清に0.5mLのクロロホルムを加え、ボルテックスで混和し、室温で2〜3分間放置した。12000rpmで10分間、4℃で遠心し、上層を新しいチューブに移した。これに0.5mLのイソプロピルアルコールを加え、混合し、室温で10分間放置した。これを15000rpm、4℃で15分間遠心して全RNAを沈殿させた。ペレットに75%エタノールを1mL加え、よく混和した後、10000rpmで5分間、4℃で遠心した。ペレットを風乾し、DNase、RNaseフリーの水に溶解し、-80℃で保存した。

上記で得られた気道由来のtotal RNA 2.5μgおよびオリゴ(dT)₁₂₋₁₈を用い、SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit (GIBCO-BRL社製)を使用し、添付のプロトコールに従ってcDNAの合成を行った。

(2) 気道cDNAからのAST PCRフラグメントの取得

ヒトASTおよびげっ歯類ASTの塩基配列の相同性を比較し、ASTS652F (配列番号40) およびASTS721F (配列番号41) で示されるフォワードプライマー、ならびにASTS1166 (配列番号42) およびAST1211 (配列番号43) で示されるリバースプライマーを作成した。このプライマーを組み合わせて使用し、Pyrobest DNAポリメラーゼ (宝酒造製) を用い、各哺乳類気道由来cDNAを鋳型として添付のプロトコールに従ってPCR反応を行った。PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った結果、目的とする475から590bp付近に増幅バンドを認めた。この増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、TAクローニングベクターに挿入し、大腸菌に形質転換してクローンを得た。プラスミドを定法に従って調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列決定を行った。その結果、ヒトASTと相同性を示す遺伝子断片がクローニングされていることが明らかとなった。

30 (3) 5'-RACE、3'-RACEによる全長哺乳類AST cDNAの取得

ウサギASTに関しては、(2) によって得られた部分塩基配列をもとに5'-

RACEおよび3'-RACE用のプライマーを合成した。サル、イヌ、ブタ、ウシASTに関しては1st RACE用のプライマー配列は3'-RACE用：配列番号40、5'-RACE用：配列番号43を用い、2nd RACE用のプライマー配列は3'-RACE用：配列番号41、5'-RACE用：配列番号42を用いた。一方、各哺乳類気道から採取したTotal RNAを1 μ g使用し、SMART-RACE Kit (Clontech社製)を用いて5'-RACE、3'-RACE用cDNAの合成を行い、5'-RACEおよび3'-RACEを施行した。PCR反応はAdvantage 2 Polymerase Mix (Clontech社製)を用い、添付のプロトコールに従って行った。5'-RACE、3'-RACEによって得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、メインの増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、TAクローニングベクター (Invitrogen社製)に挿入し、大腸菌に形質転換してそれぞれ数クローンを得た。これらの形質転換体よりプラスミドを定法に従って調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列を決定した。その結果、(2)によって得られた部分塩基配列と一致したシーケンスから始まり、5'-方向、3'-方向にヒトASTと相同性のある塩基配列が伸張されていることが確認された。決定された完全長の各哺乳類AST cDNA配列およびアミノ酸配列を示す。ブタ：配列番号26および27、サル：配列番号28および29、イヌ：配列番号30および31、ウシ：配列番号32および33、ウサギ：配列番号34および35。

20

【実施例12】 各種哺乳類ASTの酵素活性測定

(1) 各種哺乳類AST動物細胞発現用プラスミドの作製

各種哺乳類ASTのN末端、C末端をコードする遺伝子配列を基にフォワードプライマー、リバースプライマーを作製し、気道cDNAを鋳型として完全長ASTをコードするcDNAをPyrobest DNAポリメラーゼ (宝酒造社製)によってPCR増幅した。一方、pcDNA3 (Invitrogen社製)を制限酵素NruIおよびKpnIで切断したものと、ヒトゲノムよりElongation Factor-1 α (EF-1 α)のプロモーター領域をフォワードプライマー；GACTTCGCGACGTGAGGCTCCGGTGCCCGTC、リバースプライマー；GACTGGTACCAAGCTTTTCACGACACCTGAAATGGAAGを用いてPCRにより増幅した。増幅フラグメントを制限酵素

30

Nru IおよびKpn Iで切断し、上記プラスミドベクターに挿入してヒトEF-1 α のプロモーターを有するpEF9発現ベクターを構築した。PCR増幅したASTフラグメントを上記pEF9発現ベクターのヒトEF-1 α プロモーター下流のマルチクローニングサイトに挿入し、各種動物AST発現プラスミドを作製した。

- 5 塩基配列に関しては自動シーケンサーを用いてシーケンスして確認を行った。

(2) 動物培養細胞における一過性発現による酵素活性評価

- ヒト胎児腎臓由来293EBNA細胞 (Invitrogen社) を10cmシャーレで培養し、約 5.8×10^6 cellsに対して(1)で作製した各種発現プラスミド28 μ gをLipofectAMINE2000 (GibcoBRL社、
10 製) 56 μ Lを用い、添付のマニュアルに従ってトランスフェクションした。トランスフェクション3日後の細胞を5mLのM-PER (PIERCE社製) で可溶化して回収し、AST活性測定用緩衝液 (50mM Tris-HCl, 0.01% BSA, pH=8.6) 5mLを添加したものを細胞溶解物とした。これをAST
15 活性測定用緩衝液でさらに10倍希釈した後、活性測定に供した。合成基質溶液 (10mM Boc-Phe-Ser-Arg-MCAのDMSO (ジメチルスルホキシド) 溶液をAST活性測定用緩衝液にて50倍希釈したもの) 20 μ Lと上記測定用サンプル40 μ Lとを混合し、1分間あたりの蛍光強度の上昇を測定し (蛍光波長460nm、励起波長380nm)、酵素活性を求めた。結果を次表に示す。

20

	細胞溶解物 蛍光強度比 (ヒトを100)	Sup 蛍光強度比 (ヒトを100)
ヒト	100	100
サル	250	150
ブタ	92	
イヌ	40	
ウシ	16	
ウサギ	30	

(3) 哺乳類ASTの昆虫細胞発現用組換えバキュロウイルス作製

マウスAST、イヌAST、サルASTに関して、Bac-to-Bac Sy

stem (GIBCO-BRL社製)を用い、添付のプロトコールに従って昆虫細胞発現用組換えBacmidを作製し、Sf9細胞株にトランスフェクションすることにより組換えバキュロウイルスを取得した。

(4) 哺乳類ASTの昆虫細胞発現による大量発現および酵素活性測定

- 5 昆虫細胞株Tn5を大量培養し、上記組換えバキュロウイルスを感染させた。これを3日間培養することにより組換え哺乳類ASTを発現させ、発現細胞ペレットより実施例1と同様の操作を行って精製組換え哺乳類ASTを取得した。3種のトリプシン様合成基質を用いて切断活性を評価したところ、HAST同様に合成基質：Boc-Phe-Ser-Arg-pNAおよびBoc-Ser-Glu-Gly-Arg-pNA、Boc-Ser-Lys-Gly-Arg-pNAの切断活性をもっており、HAST同様のトリプシン様活性を保持していることが判明した。

[実施例13] AST添加による粘液糖蛋白合成の解析

- 15 (1) 種々のEGFR リガンドによる粘液糖蛋白の合成

1) 細胞調製

- NCI-H292細胞(ヒト肺粘膜表皮腫瘍細胞株、ATCCより購入)を10%FCS(Fetal Calf Serum)含有RPMI-1640(Gibco社製)に懸濁し、 6.0×10^4 cells/cm²の密度でLab-Tek 8ウェルチェンバースライド(Nunc社製)に播き、72時間培養後、0.1%のBSAを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

2) 薬剤処理

- 処理当日にそれぞれのウエルの培養液をEGF(5 ng/mL、ペクトンディッキンソン社製)、HB-EGF(5 ng/mL、R&D社製)、TGF- α (5 ng/mL、Peptotech社製)もしくはPBSを含むRPMI-1640(0.1%BSA含有)培地に置換して処理を開始し、24時間、37℃でインキュベーションした。

3) AB-PAS(Alcian Blue-Periodic Acid/Schiff)染色

- 30 24時間所定の処理を行った後、培養上清を除去し、PBSで1回洗浄後、4%パラホルムアルデヒド/PBSを添加し、室温で1時間放置して細胞を固定した。

つぎにMilliQ水で2回洗浄後、AB-PAS染色を実施した。染色は成書に従って実施した（「新染色法の全て」p136-150（医薬出版社））。染色後、70、80、100%エタノールに順次5分間ずつ浸漬して脱水し、さらにAquatex（Merck社製）を用いて封入し、光学顕微鏡で染色像を観察した。結果を次表および図1、図2に示す。この結果より、HAST、TGF- α 、EGF、HB-EGFはいずれも粘液糖蛋白の産生を亢進させることが明らかとなった。

培養条件	AB-PAS染色強度
PBS添加	—
EGF添加	++++++
HB-EGF添加	++++++
TGF- α 添加	++++++

培養条件	AB-PAS染色強度
PBS添加	—
HAST添加	++++
HB-EGF添加	++++++
TGF- α 添加	++++++

10 (2) HASTによる粘液糖蛋白合成とHAST活性阻害効果の検討

1) 細胞調製

NCI-H292細胞（ATCCより購入）を10%FCS含有RPMI-1640（Gibco社製）に懸濁し、 6.0×10^4 cells/cm²の密度でLab-Tek 8ウェルチェンバースライド（Nunc社製）に播き、72時間培養後、0.1%のBSAを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

2) 薬剤処理

処理当日にそれぞれのウェルの培養液をPBS単独、PBSとロイペプチン（100 μ M、SIGMA社製）、HAST単独（300mU/mL）、HAST（300mU/mL）とロイペプチン（100 μ M）、もしくは99℃で10分間加熱変性させたHAST（300mU/mL）を含むRPMI-1640（0.1% B

SA含有) 培地に置換して処理を開始し、37℃で24時間インキュベーションを行った。

3) AB-PAS染色

- 24時間所定の処理を行った後、培養上清を除去し、PBSで1回洗浄後、4% 5 パラホルムアルデヒド/PBSを添加し、室温で1時間放置して細胞を固定した。つぎにMilliQ水で2回洗浄後、AB-PAS染色を実施した。染色は成書に従って実施した(「新染色法の全て」p136-150(医薬出版社))。染色後、70、80、100%エタノールに順次5分間ずつ浸漬して脱水し、さらに Aquatex (Merck社製) を用いて封入し、光学顕微鏡で染色像を観察した。
- 10 結果を次表および図3、図4に示す。この結果からプロテアーゼ阻害剤や、加熱処理でHASTの活性を阻害することにより、HASTによって惹起される粘液糖蛋白質の産生亢進を抑制できることが示された。

培養条件	AB-PAS染色強度
PBS添加	—
PBS/ロイペプチン添加	—
HAST添加	+++++
HAST/ロイペプチン添加	—

培養条件	AB-PAS染色強度
PBS添加	—
HAST添加	+++++
加熱変性HAST添加	—

15

[実施例14] AST添加によるMuc5ACのmRNA発現量のリアルタイムPCR法による解析

(1) 阻害剤の濃度依存的なMuc5AC産生上昇阻害の検討

1) 細胞

- 20 NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10%FCS含有RPMI-1640(Gibco社製)に懸濁して 6.0×10^4 cells/cm²の密度で96ウェルプレート(Falcon社製)に播き、72時間培養後に0.1%のBSA

を含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

2) 薬剤処理

細胞に添加する前に種々の濃度のロイペプチンと300mU/mLのHASTとを氷上で30分間反応させた。さらに37℃に加温後、ウェルの培養液をHAST
5 もしくはロイペプチンを含む培地と全交換して処理を開始し、24時間処理を行った。対照として99℃で10分間加熱変性させたHAST (300mU/mL)、EGF単独 (1ng/mL)、EGF (5ng/mL) とロイペプチン (10^{-5} M) との併用、も同様に処理した。標本数は3で行った。

3) RNA抽出

10 QIAGEN社のRNeasy Mini KitとRNase-free DNaseを用いて各ウェルごとに抽出した。それぞれ30μLのRNA溶液を得た。

4) cDNA合成

QIAGEN社のOmniScript-RTを使用した。ランダムプライマーを使い、0.25μgのRNAを用いてcDNA合成反応を行い、それぞれ20μ
15 LのcDNA溶液を得た。一部を水で5倍希釈し、TaqMan Assayのサンプルとした。

5) TaqMan Assay

EGF 処理サンプルを使って連続5倍希釈でスタンダードを調製した。5倍希釈したcDNA、およびスタンダードを鋳型としてPCRを行った。βアクチンは市
20 販のプライマーとプローブを用いた (ABI社製)。また、Muc5ACではフォワードプライマーとして、5'-TCAACGGAGACTGCGAGTACAC-3' を、リバースプライマーとして5'-TCTTGATGGCCTTGGAGCA-3' を、プローブとして5'-ACTCCTTTCGTGTTGTCACCGAGAACGTC-3' を用いた。プライマーおよびプローブはPrimer
25 Express Ver 1.0を用いてデザインした。プライマーはファルマシア社に外注して合成し、プローブはABI社に外注して合成した。PCRはTaqMan Universal PCR Mix (ABI社製) を用いてGeneAmp 5700により手順書に従って行った。増幅反応は、50℃ 2分、95℃ 10分処理した後、95℃ 15秒、60℃ 1分で、40サイクル行った。

30 6) 解析

Muc5AC、βアクチンともに得られたCt値と標準直線より各サンプルでの

発現量を相対比較した。さらに、Muc 5 ACの数値を β アクチンの数値で除して補正した。最終的にそれぞれ処理サンプルでの値を無処理群での平均値で除して、増加倍率としてデータ表示した。結果を図5に示す。

この結果から、プロテアーゼ阻害剤や、加熱処理でHASTの活性を阻害することによりHASTによって惹起されるMuc 5 ACの遺伝子発現亢進を抑制できることが示された。

(2) 抗EGF-R抗体のMuc 5 AC産生上昇阻害の検討

1) 細胞

NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10%FCS含有RPMI-1640(Gibco社製)に懸濁し、 6.0×10^4 cells/cm²の密度で96ウェルプレート(Falcon社製)に播き、72時間培養後に0.1%のBSAを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

2) 薬剤処理

①EGFR中和抗体処理: 10 μ g/mLの濃度のEGFR中和抗体(clone LA1, Transduction社製)もしくは対照として10 μ g/mLの濃度のnormal mouse IgG1(R&D社製)で37℃、30分間前処理した後、normal mouse IgG1とHAST(300mU/mL)、EGFR中和抗体とHAST(300mU/mL)、normal mouse IgG1とEGF(1ng/mL)、もしくはEGFR中和抗体とEGF(1ng/mL)を含むRPMI-1640(0.1%BSA含有)に培地を全交換して処理を開始し、24時間処理した。標本数は3で行った。

②ロイペプチン処理: HAST(300mU/mL)とEGF(1ng/mL)を氷上でロイペプチン(10^{-4} M)で30分間前処理し、37℃に加温した後、ウェル中の培地と全交換し処理を開始し、24時間処理した。標本数は3で行った。

25 3) RNA抽出

QIAGEN社のRNeasy Mini KitとRNase-free DNaseを用いて各ウェルごとに抽出した。それぞれ30 μ LのRNA溶液を得た。

4) cDNA合成

QIAGEN社のOmniScript-RTを使用した。ランダムプライマーを使い、0.25 μ gのRNAを用いてcDNA合成反応を行い、それぞれ20 μ LのcDNA溶液を得た。一部を水で5倍希釈し、TaqMan Assayのサン

プルとした。

5) TaqMan Assay

EGF 処理サンプルを用い、連続5倍希釈でスタンダードを調製した。5倍希釈したcDNAおよびスタンダードを鋳型としてPCRを行った。βアクチンは市販のプライマーとプローブを用いた(ABI社製)。また、Muc 5ACではフォワードプライマーとして、5'-TCAACGGAGACTGCGAGTACAC-3'を、リバースプライマーとして5'-TCTTGATGGCCTTGGAGCA-3'を、プローブとして5'-ACTCCTTTCGTGTTGTCACCGAGAACGTC-3'を用いた。プライマーおよびプローブはPrimer Express Ver 1.0を用いてデザインした。プライマーはファルマシア社に外注して合成し、プローブはABI社に外注して合成した。PCRはTaqMan Universal PCR Mix (ABI社製)を用いてGeneAmp 5700により手順書に従って行った。増幅反応は、50℃ 2分、95℃ 10分処理した後、95℃ 15秒、60℃ 1分で、40サイクル行った。

15 6) 解析

Muc 5AC、βアクチンともに得られたCt値と標準直線より各サンプルでの発現量を相対比較した。さらに、Muc 5ACの数値をβアクチンの数値で除して補正した。最終的にそれぞれ処理サンプルでの値を無処理群での平均値で除して、増加倍率としてデータ表示した。結果を図6に示した。

20 この結果から、プロテアーゼ阻害剤や加熱処理でHASTの活性を阻害することにより、HASTによって惹起されるMuc 5ACの遺伝子発現の亢進を抑制できることが示された。さらに、HASTがEGFRを介してMuc 5AC遺伝子発現を亢進させていることが示された。

(3) トリプシン、エラスターゼ、トリプターゼとの比較

25 1) 細胞

NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10%FCS含有RPMI-1640(Gibco社製)に懸濁し、 6.0×10^4 cells/cm²の密度で96ウェルプレート(Falcon社製)に播いて72時間培養後、0.1%のBSAを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

30 2) 薬剤処理

処理当日にウェルの培養液をHAST(0.3U/mL)、エラスターゼ(0.

1、1、10 U/mL)、トリプシン (0. 1、1、10 U/mL) およびトリプターゼ (0. 1、1、10 U/mL) を含むRPMI-1640 (0. 1%、BSA含有) に交換し、24時間処理した。

3) RNA抽出

- 5 QIAGEN社のRNeasy Mini KitとRNase-free DNaseを用いて各ウエルごとに抽出した。それぞれ30 μ LのRNA溶液を得た。

4) cDNA合成

- QIAGEN社のOmniScript-RTを使用した。ランダムプライマーを使い、0. 25 μ gのRNAを用いて、cDNA合成反応を行い、それぞれ20 μ LのcDNA溶液を得た。一部を水で5倍希釈し、TaqMan Assayのsampleとした。

5) TaqMan Assay

- EGF処理サンプルを使って連続5倍希釈でスタンダードを調製した。5倍希釈したcDNA、およびスタンダードを鋳型としてPCRを行った。 β アクチンは市販のプライマーとプローブを用いた (ABI社製)。また、Muc5ACではフォワードプライマーとして、5' -TCAACGGAGACTGCGAGTACAC -3' を、リバープライマーとして5' -TCTTGATGGCCTTGGAGCA-3' を、プローブとして5' -ACTCCTTTCGTGTTGTCACCGAGAACGTC-3' を用いた。プライマーおよびプローブはPrimer Express Ver 1. 0を用いてデザインした。プライマーはファルマシア社に外注して合成し、プローブはABI社に外注して合成した。PCRはTaqMan Universal PCR Mix (ABI社製) を用いてGeneAmp 5700により手順書に従って行った。増幅反応は、50 $^{\circ}$ C 2分、95 $^{\circ}$ C 10分処理した後、95 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C 1分で、40サイクル行った。

25 6) 解析

Muc5AC、 β アクチンともに得られたCt値と標準直線より各サンプルでの発現量を相対比較した。さらに、Muc5ACの数値を β アクチンの数値で除して補正した。最終的にそれぞれ処理サンプルでの値を無処理群での平均値で除して、増加倍率としてデータ表示した。結果を図7に示す。

- 30 この結果よりHASTはトリプシン、トリプターゼ、およびエラスターゼにはない特異的な機序によってMuc5AC遺伝子発現を亢進させていることが明らかと

なった。

【実施例15】 HASTによる細胞膜表面上のEGF-L (EGFおよびHB-EGF) の切断

5 (1) HASTによるH292細胞膜表面上のEGFおよびHB-EGF抗原の切断

1) 細胞

NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10cmディッシュを用い、10%FCS含有RPMI-1640中でコンフルエントになるまで培養した後、培地を0.1%BSA含有RPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

- 10 PBSで洗浄後、5mMのEDTAを含有するPBS中、37℃で5分間処理して浮遊させた後、0.1%BSA含有RPMI-1640に 1.0×10^7 cells/mLの密度で懸濁させた。

2) 薬剤処理

- 15 2倍濃度のHAST(600mU/mL)を含む0.1%BSA含有RPMI-1640と上述した細胞懸濁液とを等量混合し、37℃で30分間反応させた(終濃度:細胞は 5.0×10^6 cells/mL、HASTは300mU/mL)。氷冷した1%FCS含有PBSを反応液量の5倍量添加して反応を停止させた後、表面抗原解析に供した。

3) 表面抗原解析

- 20 所定の処理を行った細胞を 1.0×10^7 cells/mLの密度で1%FCS含有PBSに懸濁した。調製した細胞懸濁液100 μ Lに一次抗体(EGFのバックグラウンド染色:normal mouse IgG1(R&D社製)を1 μ g、EGF染色:抗EGFマウスモノクローナル抗体(R&D社製)を1 μ g、HB-EGFバックグラウンド染色:一次抗体は添加しない、HB-EGF染色:抗HB-EGFヤギポリクローナル抗体(R&D社製)を2 μ g)を添加して氷上で30分間反応させた。5mLの1%FCS含有PBSで一回洗浄した後、2次抗体(EGFバックグラウンド染色およびEGF染色:FITC conjugated F(ab')₂ fragment to mouse IgG(Dako社製)、HB-EGFバックグラウンド染色およびHB-EGF染色:Swine Anti Goat Ig's Fluorescein Conjugate(KPL社製))を2 μ g添加し、さらに氷上で30分間反応させた。5mLの1%FCS
- 25
- 30

含有PBSで1回洗浄した後、Cell Fix (ベクトン ディッキンソン社製) を添加して細胞を固定した。表面抗原の発現はFACS Calibur (ベクトン ディッキンソン社製) を用いて測定し、Cell Quest (ベクトン ディッキンソン社製) により解析した。発現強度の指標として平均蛍光強度を次

5 表に示した。

この結果より、HASTが細胞膜表面上のproEGFおよびproHB-EGFを切断させることが示された。

HAST処理による細胞膜表面上のEGF、HB-EGF発現強度の変化

	バックグラウンド	PBS	HAST
EGF	4.62	7.26	4.88
HB-EGF	4.5	8.72	6.94

10

(2) AST活性阻害効果の検討

1) 細胞

NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10cmディッシュを用い、10%FCS含有RPMI-1640中でコンフルエントになるまで培養させた後、

15 培地を0.1%BSA含有RPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。PBSで洗浄後、5mMのEDTAを含有するPBS中で37℃で5分間処理して浮遊させた後、0.1%BSA含有RPMI-1640に 1.0×10^7 cells/mLの密度で懸濁させた。

2) 薬剤処理

20 HAST (600mU/mL) とロイペプチン (10 μ M) もしくはBB1101 (5 μ M) を0.1%BSA含有RPMI-1640中、氷上で30分間反応させた後、あらかじめロイペプチン (10 μ M) もしくはBB1101 (5 μ M) でそれぞれ37℃、30分間前処理した細胞懸濁液に等量添加し、さらに37℃で30分間処理した (終濃度: HASTは300mU/mL、ロイペプチンは10 μ M、

25 BB1101は5 μ M、細胞は 5.0×10^6 cells/mL)。氷冷した1%FCS含有PBSを反応液量の5倍量添加して反応を停止させた後、表面抗原解析に供した。

3) 表面抗原解析

所定の処理を行った細胞を 1.0×10^7 cells/mLの密度で1%FCS含有PBSに懸濁した。調製した細胞懸濁液100 μ Lに一次抗体（EGFのバックグラウンド染色：normal mouse IgG1（R&D社製）を1 μ g、EGF染色：抗EGFマウスモノクローナル抗体（R&D社製）を1 μ g、HB-EGFバックグラウンド染色：抗体は添加しない、HB-EGF染色：抗HB-EGFヤギポリクローナル抗体（R&D社製）を2 μ g）を添加して氷上で30分間反応させた。5mLの1%FCS含有PBSで1回洗浄した後、2次抗体（EGFバックグラウンド染色およびEGF染色：PerCP conjugated F(ab')₂ fragment to mouse IgG（ベクトン ディッキンソン社製）、もしくはSwine Anti Goat Ig's Fluorescein Conjugateを2 μ g添加し、さらに氷上で30分間反応させた。5mLの1%FCS含有PBSで1回洗浄した後、Cell Fix（ベクトン ディッキンソン社製）を添加して細胞を固定した。表面抗原の発現はFACS Calibur（ベクトン ディッキンソン社製）を用いて測定し、Cell Quest（ベクトン ディッキンソン社製）により解析した。発現強度の指標として平均蛍光強度を次表に示した。

この結果により、プロテアーゼ阻害剤でHASTの活性を抑制することにより、HASTによって惹起される細胞膜表面上のproEGFおよびproHB-EGFの切断が抑制されることが示された。

HAST処理による細胞膜表面上のEGF、HB-EGF発現強度の変化

	バックグラウンド	PBS	HAST	HAST+ロイペプチン	HAST+BB01
EGF	8.44	10.79	8.33	10.18	7.49
HB-EGF	5.58	8.61	6.26	7.3	6.65

(3) HASTによるEGF-L（ヒトHBEGF）の切り出し評価

1) ヒトHBEGF動物細胞発現プラスミド作製

ヒト気道PolyA⁺RNA（Clontech社製）2.5 μ gおよびオリゴ

(dT)₁₂₋₁₈を用い、SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit (GIBCO-BRL社製)を使用し、添付のプロトコールに従ってcDNAを合成した。作製したヒト気道cDNAを鋳型としてヒトHB-EGFのN末端のシグナルペプチドからJaxtamembrane Domain
5 G FのN末端のシグナルペプチドからJaxtamembrane Domainを含んだ領域をコードするcDNAフラグメントをPyrobest PCR (宝酒造社製)により増幅して取得した。一方、ヒト胎盤アルカリフォスファターゼcDNAをpSEAP2-Controlベクター (Clontech社製)よりPyrobest PCRにて増幅して取得した。

10 Jaxtamembrane DomainのC末端にヒト胎盤アルカリフォスファターゼを付加したDNAフラグメント: HBEGF (Δ TM) -ALP (配列番号44) は、ヒトHB-EGFのN末端のシグナルペプチドからJaxtamembrane Domainを含んだ領域をコードするDNAフラグメントと、ヒト胎盤アルカリフォスファターゼをコードするDNAフラグメントをPCR法にて
15 連結して作製した。

実施例12 (1) で作製したpEF9ベクターのマルチクローニングサイトに、上記のHBEGFを挿入することにより、ヒトHBEGF発現プラスミド: pEF9-HBEGF (Δ TM) -ALPを作製した。

2) ヒト培養細胞におけるHBEGFの発現

20 293EBNA細胞株を 9×10^6 cells / 10 cmディッシュで播いて一晚培養し、1) で作製したヒトHBEGF発現プラスミド: pEF9-HBEGF (Δ TM) -ALPをトランスフェクションした。12 μ gのpEF9-HBEGF (Δ TM) -ALPを75 μ LのLipofectamine 2000 (GIBCO-BRL) でリポフェクションした。リポフェクションは添付のマニュアル
25 に従って行った。72時間後の細胞をピペティングで剥がし、3000 rpm、4℃で5分間遠心分離した。そのライセートを12 mLのM-PER (PIERCHE社製) で可溶化し、非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース膜 (BIO-RAD社) にブロッティングした。

3% BSAを含むPBSを用いて4℃で一晩処理後、1% BSAを含むPBSで
30 1 μ g/mLに希釈した抗ヒトHB-EGF抗体 (GENZYME社、EGFRと結合する部分を認識する抗体) と室温で1時間反応させた。ニトロセルロース膜を

- 0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、1% BSAを含むPBSで
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したSwine Anti-Goat Ig' s-ALP抗体
(BIOSOURCE社)と室温で1時間反応させた。ニトロセルロース膜を0.
05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、TBSで1回洗浄してNBT
5 (ニトロブルー、テトラゾリウムクロリド) /BCIP (5-ブロモ-4-クロロ
-3-インドリルホスフェート p-トリチン塩、PIERCE社)により室温
で5分間反応させて発色させた。
- 3) HASTによるHBEGF (ΔTM) -ALPの切断活性
M-PERで可溶化した100 μL のライセートに10 μL の組換えHAST
10 (1.56 U/mL)を加えて37°Cで一晩インキュベーションした。そのサンプ
ルを上記と同様にウエスタンブロッティングした。その結果、HAST添加のサンプ
ルでは抗ヒトHB-EGF抗体 (EGFRと結合する部分を認識する抗体)に反応
性を示すバンドが低分子量にシフトし、HB-EGFのEGFドメインを有する成
熟型が切り出され、約12 kDの位置にバンドがシフトしていることが確認された。

15.

[実施例16] HASTによるEGFRのチロシンリン酸化解析

1) 細胞

- NCI-H292細胞 (ATCCより購入)を10% FCS含有RPMI-16
40 (Gibco社製)に懸濁して 6.0×10^4 cells/cm²の密度で12
20 ウェルプレート (Falcon社製)に播いた。72時間培養後、0.1%のBS
Aを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

2) 薬剤処理

- 処理当日にウェルの培養液をHAST (0.3 U/mL)、EGF (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
L)を含むRPMI-1640 (0.1% BSA含有)に交換して30、60、
25 120、180、240分間の処理を行った。

3) 細胞溶解物の調製

- 所定の時間HASTもしくはEGFで処理した細胞を氷冷したPBSで2回洗浄
した後、氷冷したLysis緩衝液 (50mM Tris-HCl、pH7.4、5
mM EDTA、1% Triton X-100 (Sigma)、150mM Na
30 Cl、10%グリセロール、1% Protease Inhibitor Coc
ktail (Sigma)、1% Phosphatase Inhibitor

Cocktail (Sigma)) を500 μ L添加して15分間氷上で放置した後、マイクロチューブに回収した。4℃で15000回転、10分間遠心した後、上清をサンプルとして回収した。サンプルの蛋白質濃度はBioRad Protein Assay (Bio Rad社製) により測定し、すべてのサンプル中の
5 蛋白質濃度が1.48mg/mLになるように、適宜Lysis緩衝液で希釈した後、406 μ Lを以降の免疫沈降に用いた。

4) 免疫沈降

上述したように調整した細胞溶解物 (1.48mg/mL、406 μ L) に8 μ Lのagarose conjugated mouse IgG1 (サンタクル
10 ズ社製)、および20 μ LのProtein G Plus Agarose (Oncogene社製) を添加し、4℃で2時間穏やかに攪拌した。4℃で3000回転、1分間遠心した後、上清を回収し、4 μ gの抗EGFR抗体 (Clone LA1、Transduction社製) を添加して4℃で1時間穏やかに攪拌した。さらに20 μ LのProtein G Plus Agarose (Oncogene社製) を添加して4℃で一晩穏やかに攪拌した。これを4℃で3000回
15 転、1分間遠心した。上清を捨てた後、沈降物を1mLの氷冷した洗浄緩衝液 (10mM Tris-HCl、pH7.4、100mM NaCl、0.05% Tween-20 (BioRad)) で4回洗浄した後、Tween-20を含まない洗浄緩衝液で一回洗浄した。4℃で3000回転、1分間遠心した後、上清を除去し、
20 沈降物に25 μ LのSDSサンプル緩衝液 (125mM Tris-HCl、pH6.8、4% SDS、10% グリセロール、0.04% プロモフェノールブルー、4% 2-メルカプトエタノール) を添加し、99℃で5分間過熱した。室温で3000回転、1分間遠心した後、上清を回収し、ウエスタンブロッティングのサンプルとした。

25 5) ウエスタンブロッティング

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した蛋白質をセミドライトランスファー (アトー社製) を用いてナイロンメンブラン (Immobilon PVDF membrane、Millipore社製) へ転写した。ブロッキング緩衝液 (1% BSA (ベーリンガー・マンハイム社製) を含む洗浄緩衝液) 中で、4℃
30 で一晩ブロッキングした。その後、ブロッキング緩衝液で2500倍に希釈したHRP-抗ホスホチロシン抗体と室温で1時間反応させ、メンブランを洗浄緩衝液で

6回洗浄し、発色させた。

6) 発色、検出

ECLplus (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いた。洗浄後のメンブランをECL発色液中に室温で5分間浸漬した。メン
5 ブランより余剰の発色液を除いた後、サランラップ中に密封し、X線フィルムに2分～5分程度露光させた後、現像してチロシンリン酸化された蛋白質のバンドを解析した。

7) リブローピング

X線フィルムに露光後、メンブランを洗浄緩衝液で5分間、3回洗浄した。次に
10 Restore試薬 (PIERCE社製) 中、37℃で15分間振とうして、抗体を除いた。洗浄緩衝液で5分間、3回洗浄した後、ECLplusを用いて、上述した方法にて発色させ、10分間X線フィルムに露光させた。X線フィルムを現像し、何らバンドが残存していないことを確認した後、メンブランを洗浄緩衝液で5分間、3回洗浄し、さらにブロッキング緩衝液に浸漬し、4℃で一晩放置してブ
15 ッキングした。次に、ブロッキング緩衝液で0.1μg/mLに希釈した抗EGFR抗体 (Clone13 Transduction社製) 中、室温で1時間反応させた。洗浄緩衝液で6回洗浄した後、ブロッキング緩衝液で6000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham社製) 中、室温で1時間反応させた。洗浄緩衝液中で6回洗浄した後、ECLplusを用いて、上述した方法
20 に従って発色させ、EGFRのバンドを検出した。結果を図10に示す。

HASTはEGFRのチロシンリン酸化を亢進させたことより、EGFRを活性化させることが明らかとなった。

【実施例17】抗ASTポリクローナル抗体の取得

25 (1) 抗ペプチド抗体の取得

ヒトASTの187番目イソロイシンから205番目の残基までの、N末端にシステインを有する20残基のペプチド (配列番号25) をペプチドシンセサイザー (Applied Biosystems Model 431A) にて化学合成した。この合成ペプチドを10mMリン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し (10m
30 g/mL)、10mgのマレイミド活性化ヘモシアニン (Boehringer Mannheim Biochemica社製) と25℃で2時間インキュベート

した後、反応溶液を10mMリン酸緩衝液(pH7.5)に対して透析した。ヘモシアニンに結合させたペプチドを家兎の皮下に投与した(0.5mg/1回)。投与は2週間おきに6回繰り返した。全血を採取し、血清を調製した後、プロテインAセファロース4Bカラム(ファルマシア社製)で精製して抗ASTポリクローナル抗体(anti-N19 PAb)を得た。

(2) 抗組換えAST抗体の取得

実施例1で調製した組換えAST(40 μ g/1回)をフロインドのコンプリートアジュバント(BACTO社製、1:1)とともに、2週間毎に家兎に皮内投与した。これを4回行なった後、全採血をして抗血清を得た。この血清から常法に従い、プロテインAセファロース4Bカラム(ファルマシア社製)にてIgGを精製し、抗ASTポリクローナル抗体(anti-rAST PAb)を得た。

[実施例18] 抗ASTモノクローナル抗体の作製

(1) 組換えASTによるマウスの免疫

実施例1で調製した組換えASTをフロインドのコンプリートアジュバント(BACTO社製、1:1)とともに、2週間毎にBalb/cマウス(7週齢、オス)に腹腔内投与した(10-20 μ g/回/head)。これを4回行なった後、5回目は細胞融合の3日前に組換えAST溶液50 μ gを静脈内投与した。マウスの尾静脈より採血し、37℃で30分間インキュベート後、3000rpmで10分間遠心して血清を回収し、血清中の抗AST抗体価をELISAにより測定した。以下、その方法を述べる。

96穴ELISAプレート(Falcon3912、Becton Dickinson社)に0.05M Na₂CO₃ 緩衝液(pH10.5)で1 μ g/mLに希釈した組換えASTを50 μ L加え、4℃で1晩反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで3回洗浄後、室温にて3%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSで1時間処理した。0.05% Tween20を含むPBSで3回洗浄後、検体を50 μ L加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで3回洗浄後、3% BSAを含むPBSで1000倍希釈したアルカリホスファターゼと結合させたヤギ抗マウスIgG抗体(ZYMED社)を50 μ L加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで3回洗浄後、PNPP(p-nitrophenylphosphate、和光純薬)

と室温で1時間反応させ、405nmにおける吸光度を測定した。

(2) 細胞融合によるハイブリドーマの作製

細胞融合の直前にマウスを殺し、脾細胞をPBS中でホモジナイズし、残渣をナイロンメッシュで濾過後、PBSで遠心洗浄を1回行なった。この脾細胞とマウス
5 ミエローマ (P3X63Ag8U. 1) とを常法 (Kohler, Milstein; Nature, 256, 495-497, 1975) に従って細胞融合した。

すなわち、脾細胞 5×10^7 個とマウスミエローマ細胞 P3X63Ag8U. 1 (P3U1) 5×10^6 個を RPMI 1640 培地で洗浄後、1500rpmで5分間遠心し、細胞ペレットにした。35% ポリエチレングリコール液 (RPMI 1
10 640 培地 5.75mL + ポリエチレングリコール 3.5mL + ジメチルスルホキシド 0.75mL) を2分間で1mL加え、細胞をゆるやかに浮遊させた。RPMI 1640 培地を2分間で1mL加えた後、さらに2分間で2mL加えた。次にGIT-HAT 培地 (95 μ M ヒポキサンチン、0.4 μ M アミノプテリン、1.6 μ M チミジン、および5% FCSを含むGIT 培地) を2分間で4mL加えた
15 後、さらに2分間で8mL加えた。37℃で30分間インキュベート後、各ウェルあたり約 10^4 個のマウス腹腔浸出細胞を播きこんだ96穴平底プレート1枚に分注し、5% CO₂ 存在下、37℃で培養した。

1週間後にGIT-HT 培地 (GIT-HAT 培地よりアミノプテリンを除いた培地) で培地を半量交換し、さらに5% CO₂ 存在下、37℃で約1週間培養する
20 ことにより各ウェルあたり数個のハイブリドーマのコロニーを得た。

(3) ハイブリドーマのスクリーニング

2週間後に組換えASTをコートしたプレートによるスクリーニングを行なった。組換えASTの5.0mM Na₂CO₃ 緩衝液溶液 (1 μ g/mL、pH10.5) を96ウェルプレート (Falcon社、PVC製) に各ウェル当たり50 μ Lずつ
25 分注し、4℃で1晩放置した。洗浄後、3% BSA/PBSを各ウェル当たり200 μ L加え、37℃で1時間ブロッキングした。再度洗浄後、各ウェル当たり50 μ Lの培養上清を加え、室温で1時間放置し、0.05% Tween/PBSで3回洗浄した。

次に、3% BSAおよび0.2% スkimミルクを含むPBSで2000倍に希釈したやぎ抗マウスIgG-アルカリホスファターゼコンジュゲート (Tago
30 社) をウェル当たり50 μ L加え、室温で1時間放置した。再度洗浄し、0.25m

Mの塩化マグネシウムを含む1M ジエタノールアミン緩衝液(pH9.8)に溶解したp-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム塩(和光純薬)の1mg/mL溶液をウェル当り100 μ L加え、室温で30分間反応させた。その405nmにおける吸光度を96ウェルプレート用のELISAリーダー測定器(Molecular Device社Vmax)を用いて調べ、組換えASTと結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択した。

(4) ハイブリドーマのクローニング

このように選択したハイブリドーマについて限界希釈法によるクローニングを2回行ない、株化した。具体的にはマウス腹腔浸出細胞をHT培地中10⁶個/mLの割合に調製したものを各ウェルに分注し、これにウェル当り0.5個の割合でHT培地に懸濁したハイブリドーマ細胞を播き込み、5%CO₂存在下、37℃で2週間培養した。その培養上清について上記ELISA法でスクリーニングし、単一コロニーをピックアップすることで株化を行なった。

(5) ハイブリドーマの培養および抗体精製

以上の操作で得られた抗AST抗体を産生するハイブリドーマ20クローンのうち6クローンをインシュリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレナイトを含む無血清培地であるeRDF培地(Gibco BRL社)に適應させて培養し、培養上清を回収した。培養上清中の抗体をプロテインGカラムで常法により精製した。

(6) ASTモノクローナル抗体のサブタイピング

(5)の操作で得られた精製抗ASTモノクローナル抗体6クローンに関し、IsoStrip(マウスモノクローナル抗体のアイソタイピングキット、ベーリンガー社製)を用い、プロトコールに従ってサブタイピングを行った。その結果、3クローンがIgG1であり、2クローンがIgMであることが判明した。

[実施例19] 抗AST抗体によるウエスタンブロッティング

組換えASTもしくは天然ASTを還元条件下でSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後、ニトロセルロース膜(BIO-RAD社)にウエスタンブロッティングした。3%BSAを含むPBSで室温で1晩処理後、3%BSAを含むPBSで10 μ g/mLに希釈した実施例17、18で得られた抗AST抗体と室温で1時間反応させた。ニトロセルロース膜を1%BSAを含むPBSで6回洗浄

後、3% BSAを含むPBSで25 μ g/mLに希釈したアルカリホスファターゼと結合させたヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO社) と室温で1時間反応させた。ニトロセルロース膜を1% BSAを含むPBSで6回洗浄後、NBT/BICP (PIERCE社) で室温で10分間反応させ、発色させた。

- 5 これにより、それぞれの抗AST抗体が組換えASTと結合することが示された。ウエスタンブロッティングの反応性は、ポリクローナル抗体ではanti-N19 PAbの反応性が高く、anti-rAST PAbは反応性が低かった。また、anti-rAST PAbはマストセル由来トリプターゼおよびトリプシンとは交差反応性を示さなかった。なお、ネガティブコントロールとしては正常ウサギIgGを使用した。
- 10

[実施例20] AST阻害活性の評価

(1) AST活性の測定方法

測定方法、活性単位の定義は上記実施例2において示した通りである。

- 15 (2) 抗AST抗体のAST阻害活性の評価

組換えASTを2 ng/mL、BSAを0.01%含有する50mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.6) 0.5mLに対し、抗AST抗体含有溶液を50 μ L加え、37℃で30分間インキュベートした。その後、トリプシン用合成基質Boc-Phe-Ser-Arg-MCAを200 μ M含有する50mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.6) 0.5mLを加え、37℃で1時間インキュベートした。

20

次いで1mLの30% 酢酸を加え、生成したAMC量を蛍光測定により測定し (蛍光460 nm、励起光380 nm)、抗AST抗体の酵素活性阻害能を評価した。結果を図15に示す。

- 実施例において取得した組換えAST (昆虫細胞-バキュロウイルス系) を免疫して得られた抗ASTポリクローナル抗体に、236 μ g/mLの濃度で27%の活性阻害効果が認められた。
- 25

(3) 化合物のAST阻害活性の評価

- 組換えASTを2 ng/mL、Tween 20を0.01%含有する50mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.6) 0.05mLに対し、評価対象化合物として各種濃度のメシル酸ナファモスタットまたはメシル酸ガベキサート含有DMSO溶液を2 μ L、およびトリプシン用合成基質Boc-Phe-Ser-Arg-MC
- 30

Aを30 μ M含有する50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.6)0.05mLを加え、24℃で6分間インキュベートした。経時的に生成したAMC量を蛍光測定により測定し(蛍光460nm、励起光380nm)、化合物の酵素活性阻害能を評価した。結果をIC50(50%の阻害活性を示すモル濃度)として次表に

5 示す。

化合物名称	IC50 (μ M)
メシル酸ナファモスタット	0.23
メシル酸ガベキサート	0.14

[実施例21] AST測定系の構築

10 (1) ポリクローナル抗体によるサンドイッチELISA系の構築

実施例17で得られた抗ASTポリクローナル抗体(anti-rASTPA b)を用いて以下の操作を行ない、サンドイッチELISA系を構築した。

1) ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)標識抗体の調製

①抗体(F(ab')₂)の調製

15 抗体(IgG)の2.0mg/mLのPBS溶液1mLに1Mの酢酸緩衝液(pH4.2)100 μ Lと、40 μ gのペプシンを20 μ Lの同緩衝液に溶解して加え、37℃で4時間反応させた。反応終了後、PBSにて平衡化したセファデックスG25カラム(ϕ 2cm \times 45cm)を用いて分離し、抗体(F(ab')₂)を採取した。

20 ②抗体(F(ab')₂)のHRP標識

抗体(F(ab')₂)の1mg/mL、0.01Mリン酸、0.15M NaCl(pH7.4)溶液2mLに、N-(α -マレイミド安息香酸)-N-サクシニミドエステル(MBS)のジメチルホルムアミド溶液(10mg/mL)50 μ Lを添加し、25℃で30分間反応させた。次いでセファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)でゲル濾過を行ない、マ

25 レイミド化抗体と未反応MBSとを分離した。
一方、HRPの10mg/mLの0.1Mリン酸緩衝液(pH6.5)溶液2mLにS-アセチルメルカプト無水コハク酸の60mg/mLジメチルホルムアミド

溶液120 μ Lを加え、25℃で2時間反応させた。次に0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) を800 μ L、0.1M EDTAを160 μ L、1M ヒドロキシルアミン1.6mLを加え、0℃で4分間反応させた。その後、反応液をコロジオンバッグに入れ、0.1M リン酸緩衝液 (pH6.0)、5mM EDTA含有溶液を用いて4℃で3日間透析し、チオール化HRPを得た。

次に、マレイミド化抗体2mgとチオール化HRP4mgとを混合し、コロジオンバッグを用いて氷冷下に4~10mg/mLの蛋白濃度になるまで濃縮し、15~20℃で一晩放置した。その液をウルトロゲルAcA44 (ファルマシアLKB社製) を充填したカラムでゲル濾過し、抗AST (F(ab')₂) HRP標識抗体を得た。

2) 抗体固定化プレートの調製

96ウェルプレート (住友ベークライト社製、MS-3796F/カルボプレート) をよく洗浄し、抗体の20 μ g/mL PBS溶液中に4℃で一昼夜放置した。これをPBSで洗浄し、1% 牛血清アルブミン (BSA) のPBS溶液中、4℃で1昼夜放置することでポストコーティング処理を行い、抗体固定化プレートを得た。

3) 測定系の構成

2) で調製した抗AST抗体IgG固定化プレートに、精製した組換えAST (標準物質) を0~1600ng/mLの範囲で含有する1% BSA-0.1% スkimミルク含有10mM PBS (pH7.2) 溶液 (検体希釈液) 100 μ Lを添加し、25℃で4時間インキュベートした。その後、0.05% Tween20含有10mM PBS (pH7.2) により洗浄し、1) で作成した抗AST (F(ab')₂) HRP標識抗体 (500 μ g/mL) の1% BSA含有10mM PBS (pH7.2) 100倍希釈溶液を100 μ Lずつそれぞれのウェルに添加し、25℃で2時間インキュベートした。次に各ウェル内の溶液を吸引除去した後、0.05% Tween20含有10mM PBS (pH7.2) により洗浄し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩0.02%、H₂O₂ 2.5mMを含有する0.1M リン酸/クエン酸緩衝液 (pH4.3) を100 μ Lずつ各ウェルに加えた。25℃で30分間反応させた後、反応停止剤として0.5M 硫酸水溶液を100 μ Lずつ加え、酵素反応を停止させた。次にこの溶液について分光光度計を用いて450nmの波長における吸収強度を測定し、これを標準物質濃度0~1600ng/mLに対応してプロットした。結果を図16に示す。

4) 生体内成分中のASTの検出

①唾液中のASTの検出

- 3) の測定系を用いてヒト唾液中のASTを測定した。ヒトから採取した唾液を15000rpmで15分間遠心した上清を測定サンプルとした。6検体について、
- 5 原液のままと1% BSA-0.1% スkimミルク含有10mM PBS (pH7.2) 溶液 (検体希釈液) で16倍に希釈したものについて測定した。3検体に関しては測定値が低いため原液の値を採用し、他の3検体については16倍希釈の値を採用して唾液中のAST濃度とした。測定結果を検体中のAST活性 (トリプシン基質分解活性) とともに次表に示す。

10

唾液検体	AST (ng/mL)	
	ELISA	AST 活性換算*
KM123	1616	3333
KY123	24	120
KT123	22	518
HO123	720	1772
KY112	25	208
HO112	784	2349

*組換えHAT換算トリプシン様酵素活性

②喀痰中のASTの検出

- 喀痰を慢性気道炎症患者より採取し、9倍量の生理食塩水にて希釈した後、ホモジェナイズし、10000×gで10分間遠心した上清を測定検体とした。検体を
- 15 20倍希釈して測定を行った結果を図17に示す。膿性痰のほうが粘液性痰より低い測定値を示した。

ここで、粘液性-粘液膿性痰は以下の患者より採取した。

CB; 慢性気管支炎

SecCB; 続発性気管支炎

20

BA; 気管支喘息

BE ; 気管支拡張症

DPB ; びまん性汎細気管支炎

また、膿性痰は以下の患者より採取した。

BE ; 気管支拡張症

5 DPB ; びまん性汎細気管支炎

(2) モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体によるサンドイッチELISA系の構築

1) 各抗ASTモノクローナル抗体の液相抗原反応性の評価

サブタイピングによりIgG1タイプであった3種の抗ASTモノクローナル抗体に関して、液相中の組換えASTに対する結合性の評価を行った。

96ウェルプレートに各抗ASTモノクローナル抗体のPBS溶液（1および5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）をウェルあたり50 μL 加え、4℃で一晩静置してプレートに抗体を固定化した。調製した抗ASTモノクローナル抗体固定化プレートに、精製した組換えAST（標準物質）を0～300 ng/mL の範囲で含有する1% BSA-0.1% スキムミルク含有10mM PBS（pH7.2）溶液（検体希釈液）100 μL を添加し、25℃で4時間インキュベートした。その後、0.05% Tween 20含有10mM PBS（pH7.2）で洗浄し、（1）1）で作成したHRP標識抗体（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を1% BSA含有10mM PBS（pH7.2）で100倍に希釈した溶液を100 μL ずつそれぞれのウェルに添加し、25℃で2時間インキュベートした。次に、各ウェル内の溶液を吸引除去した後、0.05% Tween 20含有10mM PBS（pH7.2）で洗浄し、3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン塩酸塩0.02%、 H_2O_2 2.5mMを含有する0.1M リン酸/クエン酸緩衝液（pH4.3）を100 μL ずつ各ウェルに加えた。25℃で30分間反応させた後、0.5M 硫酸水溶液を100 μL ずつ加えて酵素反応を停止させた。次に、この溶液につき分光光度計を用いて450nmの波長における吸収強度を測定し、これを標準物質濃度0～300 ng/mL に対してプロットした。結果を図18に示す。

2) 測定系の構築

①ビオチン化抗体の作製

30 1) の評価結果において最も液相抗原反応性の高かった#B3抗ASTモノクローナル抗体および実施例17で得られた抗ASTポリクローナル抗体（anti-

rAST PAb) を用いてIgGのビオチン化を以下のように行った。

1~3mg/mLのIgG/PBS (-) 溶液1mLと、等量の0.2M NaHCO₃ (pH8.0) を混合し、つぎに100倍のモル濃度のビオチン化試薬10mMを加え、37℃で1時間インキュベートした。ビオチン化試薬はNHS-LC-Biotin (PIERCE社製#21335) をジメチルホルムアミドで10mMに溶解し使用した。その後、10分の1量の1M モノエタノールアミンを加え、さらに37℃で1時間インキュベートした。この反応液をPBS (-) にて2.5mLにメスアップし、G-25ゲル濾過カラムにかけ、PBS (-) で流出させてビオチン化IgGを回収した。さらに、終濃度3%になるようにBSAを加え、終濃度0.1%になるようにNaN₃を加えて保存した。

②抗体固定化プレートの調製

96ウェルプレート (住友ベークライト社製、MS-3796F/カルボプレート) をよく洗浄し、抗体 (#B3およびanti-rAST PAb) の20μg/mLのPBS溶液を100μLずつ各ウェルに加え、4℃で1昼夜放置した。これをPBS-0.05% Tween20で洗浄し、1% 牛血清アルブミンのPBS溶液を380μLずつ各ウェルに加え、4℃で1昼夜放置するポストコーティング処理をして抗体固定化プレートを得た。

③測定系の構築

②で調製した抗AST IgG固定化プレートに、精製した組換えAST (標準物質) を0~400ng/mLの範囲で含有する1% BSA-0.1% スkimミルク含有10mM PBS (pH7.2) 溶液 (検体希釈液) 50μLおよび①で作製したビオチン化IgGを10μg/mL含有する1% BSA-0.1% スkimミルク含有10mM PBS (pH7.2) 溶液を50μL添加し、4℃で一晩静置した。つぎにプレートを洗浄した後、100μL/ウェルでストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (TAGO社製、#SNN1004) を1万倍希釈した1% BSA-0.1% スkimミルク含有10mM PBS (pH7.2) 溶液を加え、25℃で1時間インキュベートした。次に各ウェル内の溶液を吸引除去した後、0.05% Tween20含有10mM PBS (pH7.2) で洗浄し、3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン塩酸塩0.02%、H₂O₂ 2.5mMを含有する0.1M リン酸/クエン酸緩衝液 (pH4.3) を100μLずつ各ウェルに加えた。25℃で15分間反応させた後、0.5M 硫酸水溶液を100μLずつ加え

て酵素反応を停止させた。次いで、この溶液につき分光光度計を用いて450 nmの波長における吸収強度を測定し、これを標準物質濃度0~200 ng/mLに対してプロットした。結果を図19に示す。

5 産業上の利用可能性

- 本発明によれば、プロペプチド部分の全体または一部がトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合する構造を有するASTが提供される。これを用いて該構造を有する酵素のPARを活性化または粘液産生亢進、EGFRシグナル伝達系活性化、細胞内カルシウム流入惹起を指標とした阻害剤のスクリーニング系を構築し、阻害剤をスクリーニングすることによって、AST阻害剤および阻害ポリペプチド（阻害抗体を含む）を得ることができる。このようにして得られたAST阻害剤もしくはASTのPAR活性化阻害剤または粘液産生亢進阻害剤、EGFRシグナル伝達系活性化阻害剤、細胞内カルシウム流入惹起阻害剤を治療薬として用いることにより、ASTのもつPAR活性化作用、EGFRシグナル伝達系活性化作用、細胞内カルシウム流入惹起作用を介することによる広義の気道炎症への作用、粘液分泌亢進作用、気道リモデリングの作用、粘液せん毛生態防御系に対する作用、凝固・線溶系における作用、細胞増殖作用あるいは癌の増殖や転移に関する作用、抗ウイルス感染作用等の生理作用を抑制もしくは修飾し、発症の予防あるいは病態における改善および治療に用いることが期待できる。
- また、本発明のマウスASTなど動物ASTの配列に基づいた、動物ASTの蛋白発現あるいは遺伝子発現を測定あるいは制御することにより、どのような病態モデル動物においてどのような時期にASTが病態に関与しているかを判定することができる。また、本発明を利用することにより選ばれたAST阻害剤および阻害ポリペプチド（阻害抗体を含む）の治療効果判定や臨床投与量の推定をすることができる。

さらに、本発明のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色により、組織での発現部位を検出することができる。

- また、本発明のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた酵素免疫測定系あるいは診断薬、診断キットによれば、例えば唾液中、喀痰中あるいは血清中のAST濃度を測定することができ、AST関与の病態の把握、診断に有用である。

請求の範囲

1. 配列番号1に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる蛋白であって、1番目のMetから186番目のArgの間のアミノ酸配列の全部もしくは一部からなるプロペプチド部分と、187番目のIleから418番目のIleまでの232アミノ酸の配列からなるトリプシン様蛋白部分とが1本のジスルフィド結合で連結されている構造を有する気道特異的トリプシン様酵素。
5
2. 配列番号1に示される気道特異的トリプシン様酵素と66%以上のホモロジーを有する哺乳類のカウンターパート蛋白であって、該プロペプチド部分に相当する部分と該トリプシン様蛋白部分に相当する部分とが1本のジスルフィド結合で連結されている構造を有する哺乳類気道特異的トリプシン様酵素。
10
3. 酵素基質と測定対象化合物もしくはポリペプチドを混合し、これらと請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素もしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織を適切な条件下にインキュベートして該酵素基質と反応させ、その反応生成物を測定することにより測定対象化合物もしくはポリペプチドの気道特異的トリプシン様酵素の阻害活性を検出する方法。
15
4. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素もしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、さらにプロテアーゼ活性化受容体発現細胞とを混合し、プロテアーゼ活性化受容体シグナル伝達経路の活性化を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドの気道特異的トリプシン様酵素によるプロテアーゼ活性化受容体シグナル伝達経路の活性化に対する阻害活性を検出する方法。
20
25
5. プロテアーゼ活性化受容体がPAR2である請求項4に記載の検出方法。
6. 細胞内カルシウム濃度を指標とし、請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素による細胞内カルシウム流入惹起に対する測定対象化合物もしくはポリペプチドの阻害活性を評価する方法。
30

7. IL-8の遊離量もしくは発現量またはプロモーターの転写活性を指標とし、請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素によるIL-8遊離亢進作用に対する測定対象化合物もしくはポリペプチドの阻害活性を評価する方法。

5

8. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素もしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、さらに粘液産生能を有する細胞とを混合し、粘液産生能を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドの気道特異的トリプシン様酵素による粘液産生亢進に対する阻害活性を検出する方法。

10

9. 粘液産生能を測定する方法がAB-PAS染色法である請求項8に記載の検出方法。

15 10. 粘液産生能の指標がMuc5AC発現量である請求項8に記載の検出方法。

11. 粘液産生能の指標がEGFR-Lの遊離量もしくは産生量である請求項8に記載の検出方法。

20 12. 粘液産生能の指標がEGF-Rシグナル伝達経路の活性化である請求項8に記載の検出方法。

13. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素もしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、EGFRシグナル伝達系を有する細胞とを混合し、EGFRシグナル伝達系活性化を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドの気道特異的トリプシン様酵素によるEGFR経路活性化亢進に対する阻害活性を検出する方法。

25

14. 請求項1または2に記載の気道特異的トリプシン様酵素をコードする遺伝子、または該遺伝子由来のmRNAもしくはcDNA。

30

15. 請求項14に記載の遺伝子、mRNA、もしくはcDNAの全部または一部を用いて作製された気道特異的トリプシン様酵素の発現ベクター。
16. 請求項15記載の発現ベクターがトランスフェクトもしくはトランスフォームされた細胞。
17. 請求項16記載の細胞を培養し、培養液から請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素を精製する方法。
18. 請求項17記載の方法を用いて精製された請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素。
19. 請求項14に記載の遺伝子、mRNA、もしくはcDNAの全体もしくは一部の情報を用い、それらの核酸に対応する気道特異的トリプシン様酵素遺伝子の発現量を検出する方法。
20. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素の活性化過剰もしくはアプレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与し、その効果を判定することからなる、気道特異的トリプシン様酵素の活性を阻害、または該酵素の活性化を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。
21. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素によるプロテアーゼ活性化受容体の活性化過剰もしくはアプレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与し、その効果を判定することからなる、気道特異的トリプシン様酵素によるプロテアーゼ活性化受容体活性化を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。
22. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素による粘液産生亢進もしくはアプレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与し、その効果を判定することからなる、

気道特異的トリプシン様酵素による粘液産生亢進を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。

23. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素によるEGFR経路
5 活性化亢進もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に
対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与し、その効果を判定すること
からなる、気道特異的トリプシン様酵素によるEGFR経路活性化亢進を阻害す
る物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。

- 10 24. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素に特異的に結合する
抗体。

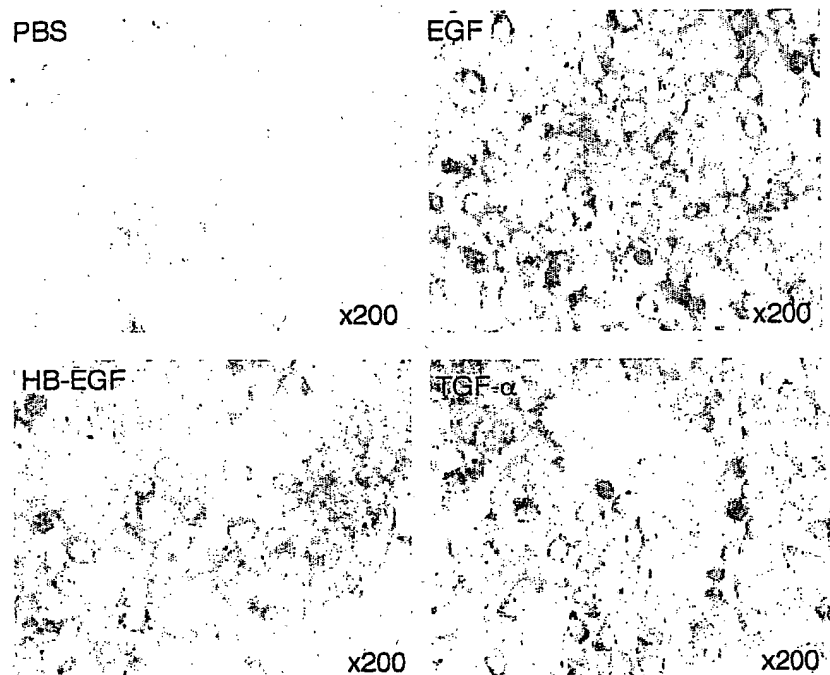
25. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素に特異的に結合する
モノクローナル抗体。

15

26. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素活性を阻害し、およ
び/またはその活性化を阻害するモノクローナル抗体。

- 20 27. 請求項24ないし26のいずれかに記載の抗体を用いて気道特異的トリプシ
ン様酵素を検出し、または測定する方法。

図 1



2/16

☒ 2

PBS

HAST

x200

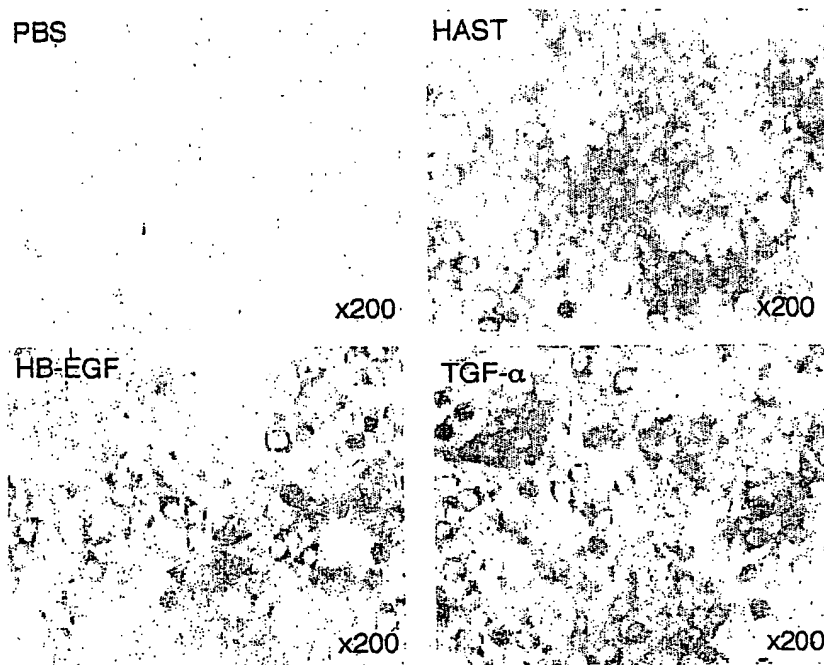
x200

HB-EGF

TGF- α

x200

x200



3/16

図 3

PBS

PBS+ ロイペプチン

HAST

HAST+ロイペプチン

x200

x200

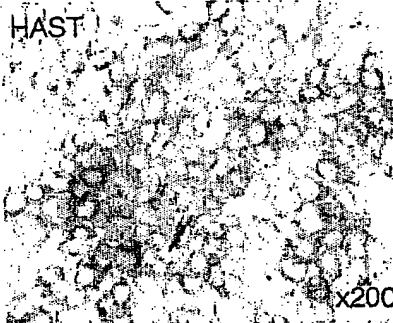
x200

x200

4/16

図 4

PBS

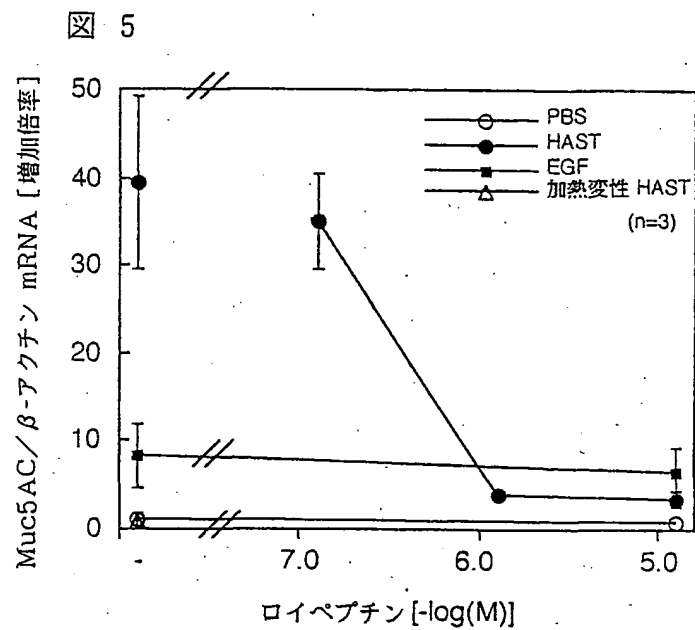


x200

加熱変性HAST

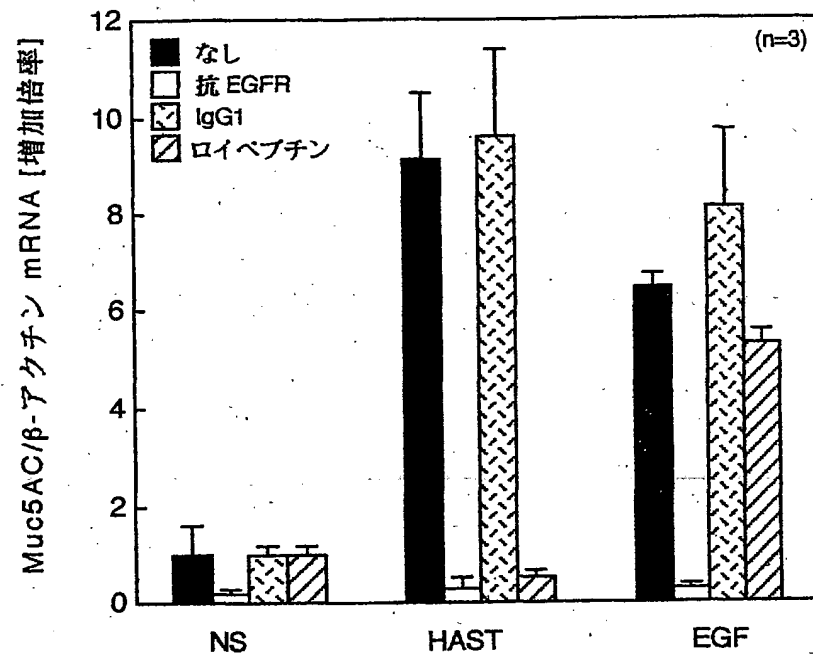
x200

5/16



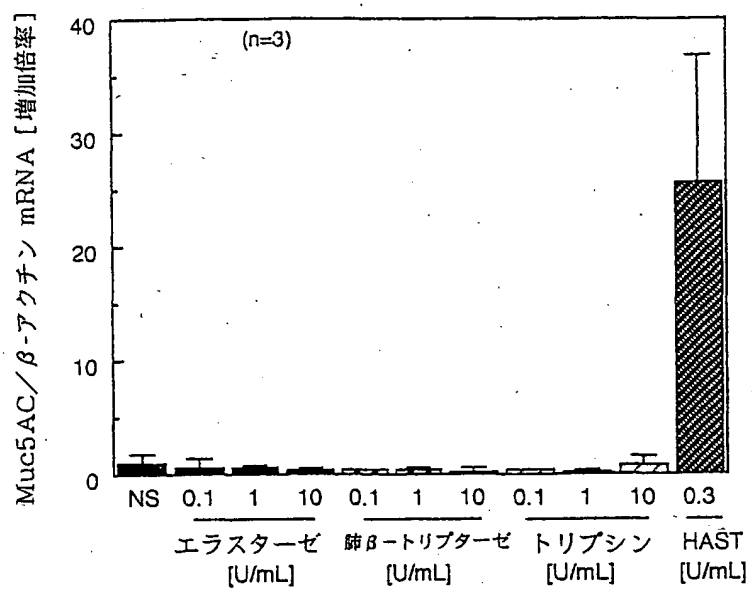
6/16

図 6



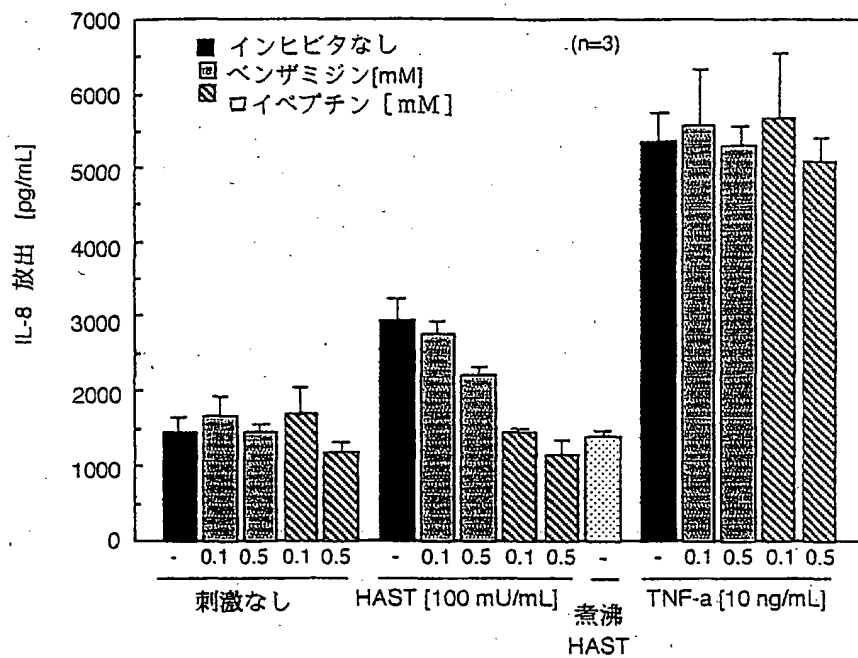
7/16

図 7



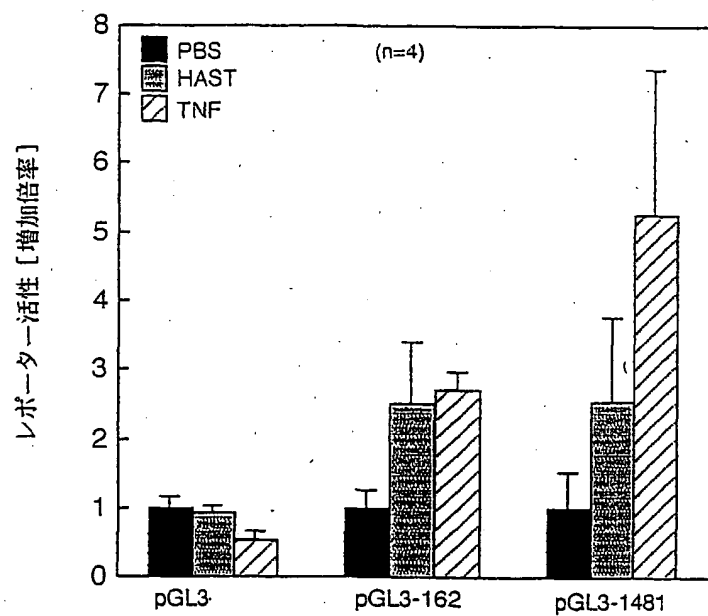
8/16

図 8



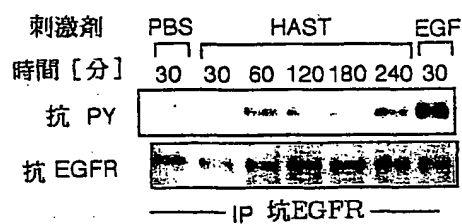
9/16

図 9



10 / 16

图: 10



11/16

図 11.

マウス AST.蛋白	MYRPRPMLSP	SRFFTPFAVA	FVVIITVGLL	AMMAGLLIHF	LAFDKKAYFY	50
ヒト AST.蛋白	MYRPARVTST	SRFLNPYVVC	FIVVAGVVIL	AVTIALLVYF	LAFDQKSYFY	50
コンセンサス	MYRP....S.	SRF..P..V.	F.V...V..L	A....LL..F	LAFD.K.YFY	50
	HSSFQILNVE	YTEALNSPAT	HEYRTLSERI	EAMITDEFRG	SSLKSEFIRT	100
	RSSFQLLNVE	YNSQLNSPAT	QEYRTLSGRI	ESLITKTFKE	SNLRNQFIRA	100
	.SSFQ.LNVE	Y...LNSPAT	.EYRTLS.RI	E..IT..F..	S.L...FIR.	100
	HVVKLRKEGT	GVVADVVMKF	RSSKRNNRKV	MKTRIQSVLR	RL-SSSGNLE	149
	HVAKLRQDGS	GVRADVVMKF	QFTRNNNGAS	MKSRIESVLR	QMLNNSGNLE	150
	HV.KLR..G.	GV.ADVVMKFNN...	MK.RI.SVLRSGNLE	150
	IAPSNETTSL	TDQDTENVLT	QECGARPDLI	TLSEERIIGG	MQAEPGDWPW	199
	INPSTETTSL	TDQAAANWLI	NECGAGPDLI	TLSEQRILGG	TEAEEGSWPW	200
	I.PS.EITSL	TDQ...N.L.	.ECGA.PDLI	TLSE.RI.GG	..AE.G.WPW	200
	QVSLQLNNVH	HCGGALISNM	WVLTAHCFK	SYPNPQYWTA	TFGVSTMSPR	249
	QVSLRLNNAH	HCGGSLINNM	WILTAHCFR	SNSNPRDWIA	TSGISTTFPK	250
	QVSL.LNN.H	HCGG.LI.NM	W.LTAHCF.	S..NP..W.A	T.G.ST..P.	250
	LRVRVRAILA	HDGYSSVTRD	NDIAVVQLDR	SVAFSRNIHR	VCLPAATQNI	299
	LRMRVRNILI	HNNYKSATHE	NDIALVRLN	SVTFTKDIHS	VCLPAATQNI	300
	LR.RVR..IL.	H..Y.S.T..	NDIA.V.L..	SV.F...IH.	VCLPAATQNI	300
	IPGSVAYVTG	WGSLEYGGNA	VTNLRQGEVR	IISSEECNTP	AGYSGSVLPG	349
	PPGSTAYVTG	WGAQYAGHT	VPQLRQGVVR	IISNDVCNAP	HSYNGAILSG	350
	.PGS.AYVTG	WG...Y.G..	V..LRQG.VR	IIS...CN.P	..Y.G..L.G	350
	MLCAGMRSGA	VDACQGDSGG	PLVQEDSRRL	WFVVGIVSWG	YQCGLPNKPG	399
	MLCAGVPQGG	VDACQGDSGG	PLVQEDSRRL	WFIVGIVSWG	DQCGLPDKPG	400
	MLCAG...G.	VDACQGDSGG	PLVQEDSRRL	WF.VGIVSWG	.QCGLP.KPG	400
	VYTRVTAYRN	WIRQQTGI				417
	VYTRVTAYLD	WIRQQTGI				418
	VYTRVTAY..	WIRQQTGI				418

12/16

図 12

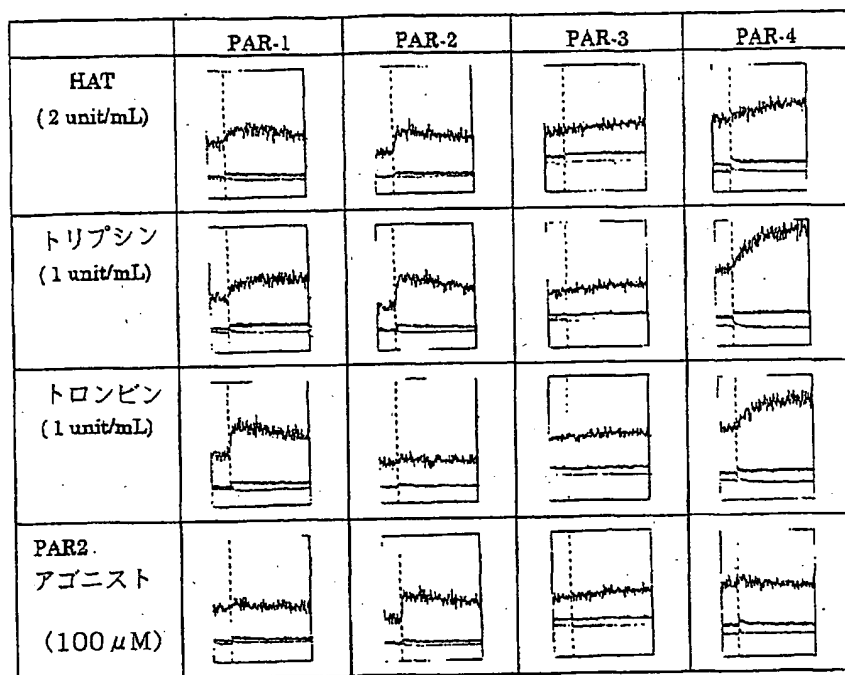
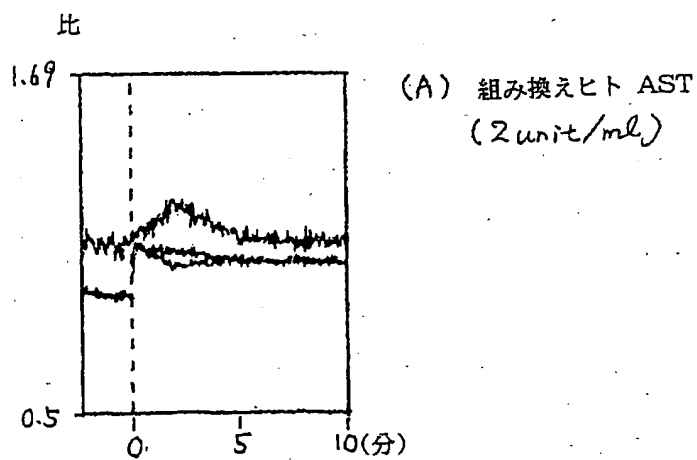


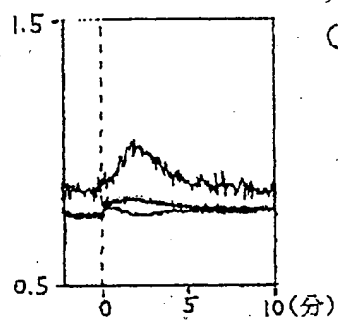
図 13



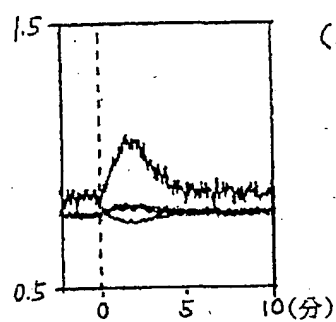
13/16

図 14

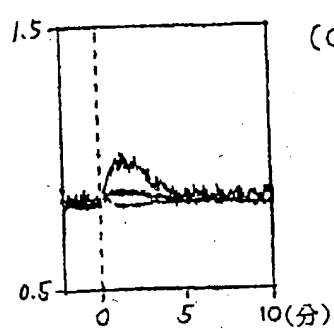
比



(A) 組み換えヒト AST (2 unit/ml)



(B) ヒトトリプシン (10 unit/ml)



(C) PAR2 アンゴニストペプチド (100 μM)

14/16

図 15

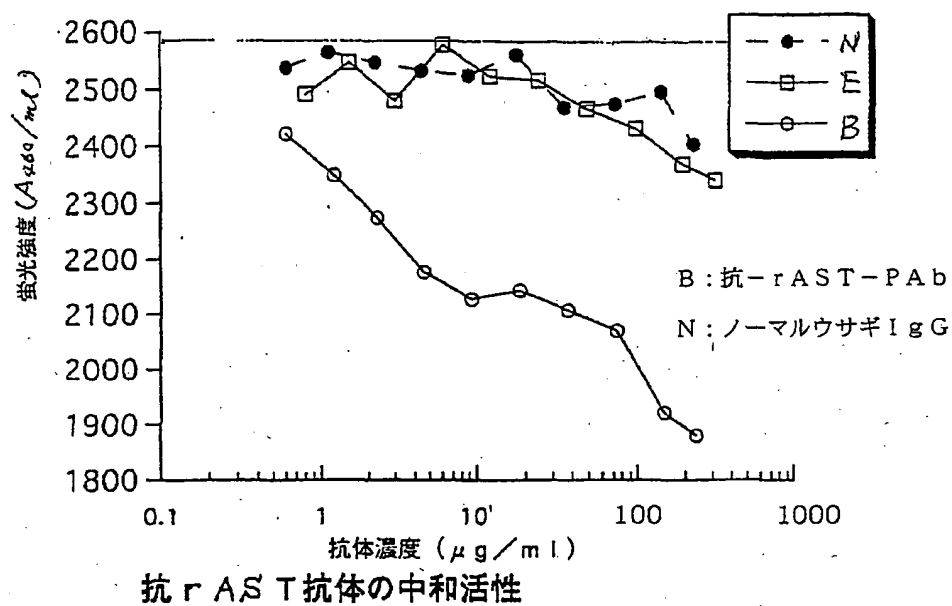
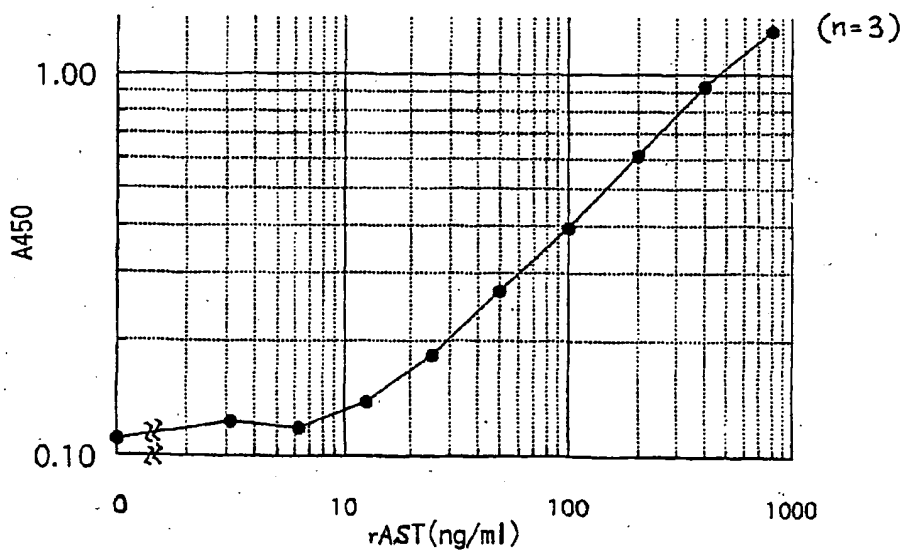
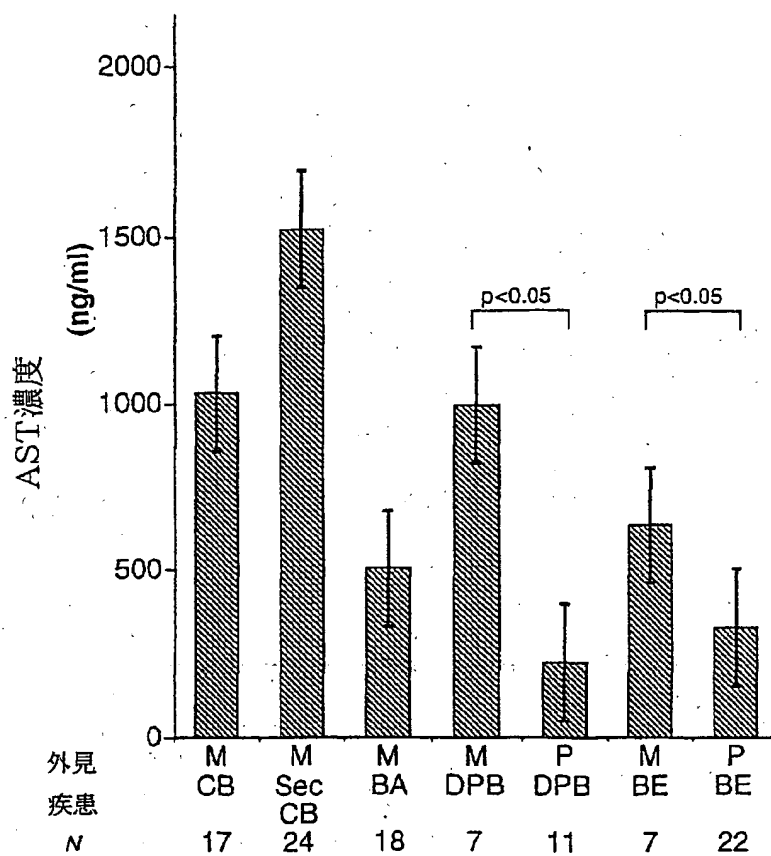


図 16



15/16

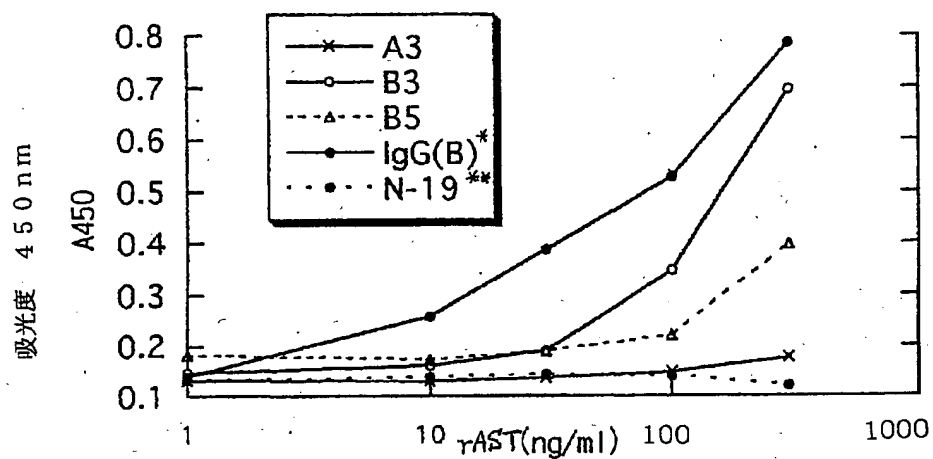
図 17



M: 粘液性痰, P: 膿性痰

16/16

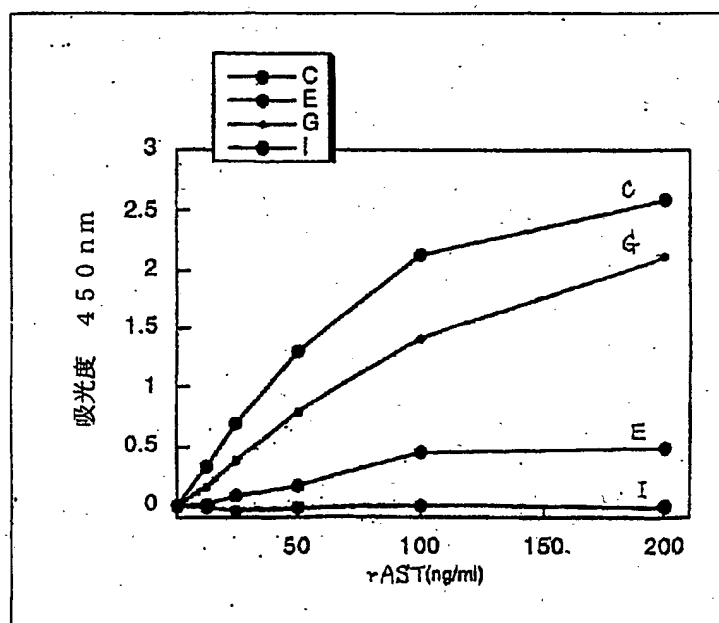
図 18



* IgG (B) ; 抗-rAST PAb

** N-19 ; 抗-N19 PAb

図 19



検出抗体
固定抗体

C ; $\frac{\text{rAST PAb}}{\text{rAST PAb}}$

G ; $\frac{\text{rAST PAb}}{\text{\#B3}}$

E ; $\frac{\text{\#B3}}{\text{rAST PAb}}$

I ; $\frac{\text{\#B3}}{\text{\#B3}}$

SEQUENCE LISTING

<110> TEIJIN LIMITED

EGUCHI, Hiroshi

CHOKKI, Manabu

YAMAMURA, Satoshi

MITA, Reiko

MASEGI, Tsukio

<120> 気道特異的トリプシン様酵素およびその利用法

<130> T-440

<150> JP P2000-257104

<151> 2000-08-28

<150> JP P2001-059753

<151> 2001-03-05

<160> 44

<210> 1

<211> 418

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Thr Ser Thr Ser Arg Phe Leu Asn

1

5

10

15

Pro Tyr Val Val Cys Phe Ile Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu

2/79

20	25	30
Ala Val Thr Ile Ala Leu Leu Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln		
35	40	45
Lys Ser Tyr Phe Tyr Arg Ser Ser Phe Gln Leu Leu Asn Val Glu		
50	55	60
Tyr Asn Ser Gln Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg Thr		
65	70	75
Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Leu Ile Thr Lys Thr Phe Lys Glu		
80	85	90
Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Ile Arg Ala His Val Ala Lys Leu		
95	100	105
Arg Gln Asp Gly Ser Gly Val Arg Ala Asp Val Val Met Lys Phe		
110	115	120
Gln Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly Ala Ser Met Lys Ser Arg Ile		
125	130	135
Glu Ser Val Leu Arg Gln Met Leu Asn Asn Ser Gly Asn Leu Glu		
140	145	150
Ile Asn Pro Ser Thr Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp Gln Ala Ala		
155	160	165
Ala Asn Trp Leu Ile Asn Glu Cys Gly Ala Gly Pro Asp Leu Ile		
170	175	180

Thr Leu Ser Glu Gln Arg Ile Leu Gly Gly Thr Glu Ala Glu Glu

185

190

195

Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Leu Asn Asn Ala His

200

205

210

His Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Asn Met Trp Ile Leu Thr Ala

215

220

225

Ala His Cys Phe Arg Ser Asn Ser Asn Pro Arg Asp Trp Ile Ala

230

235

240

Thr Ser Gly Ile Ser Thr Thr Phe Pro Lys Leu Arg Met Arg Val

245

250

255

Arg Asn Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Lys Ser Ala Thr His Glu

260

265

270

Asn Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Asn Ser Val Thr Phe Thr

275

280

285

Lys Asp Ile His Ser Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Asn Ile

290

295

300

Pro Pro Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ala Gln Glu

305

310

315

Tyr Ala Gly His Thr Val Pro Glu Leu Arg Gln Gly Gln Val Arg

320

325

330

4/79

Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ala Pro His Ser Tyr Asn Gly
335 340 345

Ala Ile Leu Ser Gly Met Leu Cys Ala Gly Val Pro Gln Gly Gly
350 355 360

Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu
365 370 375

Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Ile Val Gly Ile Val Ser Trp Gly
380 385 390

Asp Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val
395 400 405

Thr Ala Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Gln Gln Thr Gly Ile
410 415 418

<210> 2

<211> 417

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Met Leu Ser Pro Ser Arg Phe Phe Thr
1 5 10 15

Pro Phe Ala Val Ala Phe Val Val Ile Ile Thr Val Gly Leu Leu
20 25 30

Ala Met Met Ala Gly Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Lys

5 / 79

35	40	45
Lys Ala Tyr Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile Leu Asn Val Glu		
50	55	60
Tyr Thr Glu Ala Leu Asn Ser Pro Ala Thr His Glu Tyr Arg Thr		
65	70	75
Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ala Met Ile Thr Asp Glu Phe Arg Gly		
80	85	90
Ser Ser Leu Lys Ser Glu Phe Ile Arg Thr His Val Val Lys Leu		
95	100	105
Arg Lys Glu Gly Thr Gly Val Val Ala Asp Val Val Met Lys Phe		
110	115	120
Arg Ser Ser Lys Arg Asn Asn Arg Lys Val Met Lys Thr Arg Ile		
125	130	135
Gln Ser Val Leu Arg Arg Leu Ser Ser Ser Gly Asn Leu Glu Ile		
140	145	150
Ala Pro Ser Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp Gln Asp Thr Glu		
155	160	165
Asn Val Leu Thr Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu Ile Thr		
170	175	180
Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Met Gln Ala Glu Pro Gly		
185	190	195

Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn Asn Val His His
200 205 210

Cys Gly Gly Ala Leu Ile Ser Asn Met Trp Val Leu Thr Ala Ala
215 220 225

His Cys Phe Lys Ser Tyr Pro Asn Pro Gln Tyr Trp Thr Ala Thr
230 235 240

Phe Gly Val Ser Thr Met Ser Pro Arg Leu Arg Val Arg Val Arg
245 250 255

Ala Ile Leu Ala His Asp Gly Tyr Ser Ser Val Thr Arg Asp Asn
260 265 270

Asp Ile Ala Val Val Gln Leu Asp Arg Ser Val Ala Phe Ser Arg
275 280 285

Asn Ile His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Asn Ile Ile
290 295 300

Pro Gly Ser Val Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu Thr Tyr
305 310 315

Gly Gly Asn Ala Val Thr Asn Leu Arg Gln Gly Glu Val Arg Ile
320 325 330

Ile Ser Ser Glu Glu Cys Asn Thr Pro Ala Gly Tyr Ser Gly Ser
335 340 345

7/79

Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Met Arg Ser Gly Ala Val

350

355

360

Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp

365

370

375

Ser Arg Arg Leu Trp Phe Val Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr

380

385

390

Gln Cys Gly Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr

395

400

405

Ala Tyr Arg Asn Trp Ile Arg Gln Gln Thr Gly Ile

410

415

417

<210> 3

<211> 1500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gagtggaat ctcaaagcag ttgagtaggc agaaaaaga acctcttcat 50

taaggattaa a atg tat agg cca gca cgt gta act tgc act tca 94

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Thr Ser Thr Ser

1

5

10

aga ttt ctg aat cca tat gta gta tgt ttc att gtc gtc gca ggg 139

Arg Phe Leu Asn Pro Tyr Val Val Cys Phe Ile Val Val Ala Gly

15

20

25

gta gtg atc ctg gca gtc acc ata gct cta ctt gtt tac ttt tta 184

Val Val Ile Leu Ala Val Thr Ile Ala Leu Leu Val Tyr Phe Leu

30

35

40

gct ttt gat caa aaa tct tac ttt tat agg agc agt ttt caa ctc 229

Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr Phe Tyr Arg Ser Ser Phe Gln Leu

45

50

55

cta aat gtt gaa tat aat agt cag tta aat tca cca gct aca cag 274

Leu Asn Val Glu Tyr Asn Ser Gln Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln

60

65

70

gaa tac agg act ttg agt gga aga att gaa tct ctg att act aaa 319

Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Leu Ile Thr Lys

75

80

85

aca ttc aaa gaa tca aat tta aga aat cag ttc atc aga gct cat 364

Thr Phe Lys Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Ile Arg Ala His

90

95

100

gtt gcc aaa ctg agg caa gat ggt agt ggt gtg aga gcg gat gtt 409

Val Ala Lys Leu Arg Gln Asp Gly Ser Gly Val Arg Ala Asp Val

105

110

115

gtc atg aaa ttt caa ttc act aga aat aac aat gga gca tca atg 454

Val Met Lys Phe Gln Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly Ala Ser Met

120

125

130

aaa agc aga att gag tct gtt tta cga caa atg ctg aat aac tct 499

Lys Ser Arg Ile Glu Ser Val Leu Arg Gln Met Leu Asn Asn Ser

135

140

145

gga aac ctg gaa ata aac cct tca act gag ata aca tca ctt act 544

Gly Asn Leu Glu Ile Asn Pro Ser Thr Glu Ile Thr Ser Leu Thr

150

155

160

gac cag gct gca gca aat tgg ctt att aat gaa tgt ggg gcc ggt 589

Asp Gln Ala Ala Ala Asn Trp Leu Ile Asn Glu Cys Gly Ala Gly

165

170

175

cca gac cta ata aca ttg tct gag cag aga atc ctt gga ggc act 634

Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Gln Arg Ile Leu Gly Gly Thr

180

185

190

gag gct gag gag gga agc tgg ccg tgg caa gtc agt ctg cgg ctc 679

Glu Ala Glu Glu Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Leu

195

200

205

aat aat gcc cac cac tgt gga ggc agc ctg atc aat aac atg tgg 724

Asn Asn Ala His His Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Asn Met Trp

210

215

220

atc ctg aca gca gct cac tgc ttc aga agc aac tct aat cct cgt 769

Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Asn Ser Asn Pro Arg

225

230

235

gac tgg att gcc acg tct ggt att tcc aca aca ttt cct aaa cta 814

Asp Trp Ile Ala Thr Ser Gly Ile Ser Thr Thr Phe Pro Lys Leu

240

245

250

aga atg aga gta aga aat att tta att cat aac aat tat aaa tct 859

Arg Met Arg Val Arg Asn Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Lys Ser

255

260

265

gca act cat gaa aat gac att gca ctt gtg aga ctt gag aac agt 904
Ala Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Asn Ser
270 275 280

gtc acc ttt acc aaa gat atc cat agt gtg tgt ctc cca gct gct 949
Val Thr Phe Thr Lys Asp Ile His Ser Val Cys Leu Pro Ala Ala
285 290 295

acc cag aat att cca cct ggc tct act gct tat gta aca gga tgg 994
Thr Gln Asn Ile Pro Pro Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp
300 305 310

ggc gct caa gaa tat gct ggc cac aca gtt cca gag cta agg caa 1039
Gly Ala Gln Glu Tyr Ala Gly His Thr Val Pro Glu Leu Arg Gln
315 320 325

gga cag gtc aga ata ata agt aat gat gta tgt aat gca cca cat 1084
Gly Gln Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ala Pro His
330 335 340

agt tat aat gga gcc atc ttg tct gga atg ctg tgt gct gga gta 1129
Ser Tyr Asn Gly Ala Ile Leu Ser Gly Met Leu Cys Ala Gly Val
345 350 355

cct caa ggt gga gtg gac gca tgt cag ggt gac tct ggt ggc cca 1174
Pro Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
360 365 370

cta gta caa gaa gac tca cgg cgg ctt tgg ttt att gtg ggg ata 1219
Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Ile Val Gly Ile

11/79

375

380

385

gta agc tgg gga gat cag tgt ggc ctg ccg gat aag cca gga gig 1264

Val Ser Trp Gly Asp Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val

390

395

400

tat act cga gtg aca gcc tac ctt gac tgg att agg caa caa act 1309

Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Gln Gln Thr

405

410

415

ggg atc tag tgcaacaagt gcatccctgt tgcaaagtct gtaigcaggt 1358

Gly Ile

418

gigccigtct taaattccaa agcttiacat ttcaactgaa aaagaaacta 1408

gaaatgtcct aatttaacat cttgttiacat aaatatgggt taacaaacac 1458

tgtttaacct ttctttatta ttaaagggtt tctattttct cc 1500

<210> 4

<211> 1462

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

cgccgggcag gtcaaagcag ctggacacac agaacaagg acctcttcat 50

tattcaagag taaa atg tat agg cca aga cca atg cta tca ccg tca 97

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Met Leu Ser Pro Ser

1

5

10

aga ttc ttc act ccc ttt gca gta gct ttc gtt gtc ata ata acg 142

Arg Phe Phe Thr Pro Phe Ala Val Ala Phe Val Val Ile Ile Thr

1 2/79

15

20

25

gta ggg ctc ctg gcc atg atg gca ggt cta ctt att cac ttt tta 187

Val Gly Leu Leu Ala Met Met Ala Gly Leu Leu Ile His Phe Leu

30

35

40

gct ttt gac aag aaa gct tac ttt tat cat agc agc ttt caa atc 232

Ala Phe Asp Lys Lys Ala Tyr Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile

45

50

55

cta aac gtt gaa tac act gag gct tta aac tca cca gct aca cac 277

Leu Asn Val Glu Tyr Thr Glu Ala Leu Asn Ser Pro Ala Thr His

60

65

70

gaa tac aga acc ttg agt gaa aga att gag gct atg att act gat 322

Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ala Met Ile Thr Asp

75

80

85

gaa ttt cga gga tca agt cta aaa agt gag ttt atc agg aca cat 367

Glu Phe Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ser Glu Phe Ile Arg Thr His

90

95

100

gtt gtc aaa cta aga aaa gaa ggg act ggt gtg gtt gcg gat gtt 412

Val Val Lys Leu Arg Lys Glu Gly Thr Gly Val Val Ala Asp Val

105

110

115

gtc atg aaa ttt cga tct agt aaa cgt aac aac aga aag gta atg 457

Val Met Lys Phe Arg Ser Ser Lys Arg Asn Asn Arg Lys Val Met

120

125

130

aaa acc aga att caa tct gig cta cga aga ctc agc agc tct gga 502

13 / 79

Lys Thr Arg Ile Gln Ser Val Leu Arg Arg Leu Ser Ser Ser Gly

135

140

145

aac ttg gaa ata gcc cct tgc aat gag ata aca tca ctc act gac 547

Asn Leu Glu Ile Ala Pro Ser Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp

150

155

160

cag gat aca gaa aat gtt ttg act caa gaa tgt gga gca cgt cca 592

Gln Asp Thr Glu Asn Val Leu Thr Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro

165

170

175

gac ctt ata aca ctg tca gaa gag aga atc att gga ggc atg caa 637

Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Met Gln

180

185

190

gct gag ccc ggt gac tgg ccc tgg caa gtc agt cta cag ctc aat 682

Ala Glu Pro Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn

195

200

205

aat gtc cac cac tgt gga ggt gcc ctg atc agt aac atg tgg gtc 727

Asn Val His His Cys Gly Gly Ala Leu Ile Ser Asn Met Trp Val

210

215

220

ctg aca gca gct cat tgc ttc aaa agc tat cct aat cct caa tat 772

Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Tyr Pro Asn Pro Gln Tyr

225

230

235

tgg aca gcc acc ttt ggg gtt tct aca atg agc cct agg ctg aga 817

Trp Thr Ala Thr Phe Gly Val Ser Thr Met Ser Pro Arg Leu Arg

240

245

250

14/79

gtg aga gta agg gct att tta gcc cac gac ggg tac agc tcc gta 862

Val Arg Val Arg Ala Ile Leu Ala His Asp Gly Tyr Ser Ser Val

255

260

265

act cgt gac aat gac atc gca gtt gta caa ctt gac aga tct gtc 907

Thr Arg Asp Asn Asp Ile Ala Val Val Gln Leu Asp Arg Ser Val

270

275

280

gcc ttt tcc aga aat atc cat agg gta tgt ctc cca gca gca acc 952

Ala Phe Ser Arg Asn Ile His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr

285

290

295

caa aat atc atc cct ggt tct gtc gca tat gtt acg gga tgg gga 997

Gln Asn Ile Ile Pro Gly Ser Val Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly

300

305

310

tct ctc aca tat gga ggc aac gca gtc aca aat cta cgg caa gga 1042

Ser Leu Thr Tyr Gly Gly Asn Ala Val Thr Asn Leu Arg Gln Gly

315

320

325

gaa gtc aga ala ala agt tca gaa gaa tgc aat acg cca gct ggt 1087

Glu Val Arg Ile Ile Ser Ser Glu Glu Cys Asn Thr Pro Ala Gly

330

335

340

tac agt gga agt gtc ttg cca gga atg ctg tgt gct gga atg cgt 1132

Tyr Ser Gly Ser Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Met Arg

345

350

355

tca ggg gcc glg gat gca tgc cag ggt gat tca ggt ggc ccg cta 1177

Ser Gly Ala Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu

360

365

370

gta caa gaa gac tca agg cgg ctt tgg ttt gtt gtg ggc att gtg 1222

Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Val Val Gly Ile Val

375

380

385

agc tgg gga tat cag tgt ggc ctc cca aat aag cca ggc gtg tat 1267

Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr

390

395

400

act cga gtg aca gcc tac cgc aac tgg atc aga cag cag acg gga 1312

Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asn Trp Ile Arg Gln Gln Thr Gly

405

410

415

atc tag tgcaaccgag gaaaaaacgt gccatgaggt ctcgtatcc 1358

Ile

417

aagtgtgact gactcggaig ccatggcttc acatttcaac tgcaaaggag 1408

actggaaatg ccccttctga cgtcccafta caataatigg tttaactgtt 1458

tagt 1462

<210> 5

<211> 1462

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 5

cgccgggcag gucaaagcag cuggacacac agaaacaagg acccuuucuu uauucaagag 60

uaaaaanguau aggccaagac caaugcuau accgucaaga uucuuacacuc ccuuugcagu 120

agcuuucguu gucauaauaa cgguaggguu ccuggccaug auggcagguc uacuuauuca 180

cuuuuuuagcu uuugacaaga aagcuuacuu uuaucauagc agcuuucaaa uccuaaacgu 240

ugaauacacu gaggcuuuua acucaccagc uacacacgaa uacagaaccu ugagugaaag 300

16/79

aaunagaggu augauuacug augaauuucg aggaaucaagu cuaaaaagug aguuuauacag 360
 gacacauguu gucaaacuaa gaaaagaagg gacuggugug guugcggaug uugucaugaa 420
 auuucgaucu aguaaacgua acaacagaaa gguaaugaaa accagaauuc aaucugugcu 480
 acgaagacuc agcagcucug gaaacuugga aaugccccc ucgaauagaga uaacauacac 540
 cacugaccag gauacagaaa auguuuugac ucaagaangu ggagcacguc cagaccuuau 600
 aacacuguca gaagagagaa ucauuggagg caugcaagcu gagcccgug acuggccug 660
 gcaagucagu cuacagcuca auuauugcca ccacugugga ggugcccuga ucaguaacau 720
 gugggucug acagcagcuc auugcuucaa aagcuauccu aaucucuau auuggacagc 780
 caccuuggg guuucuacaa ugagcccuag gcugagagug agaguaagg cuauuuuagc 840
 ccacgacggg uacagcucg uaacucguga caugacauc gcaguuguac aacuugacag 900
 aucugugcc uuuccagaa auauccauag gguaugucuc ccagcagcaa cccaaaau 960
 cauccuggu ucugucgcu auguuacagg auggggaucu cucacauaug gaggaacgc 1020
 agucacaaau cuacggcaag gagaagucag aauaauaagu ucagaagaau gcaauacgcc 1080
 agcugguuac aguggaagug ucuugccagg aaugcugugu gcuggaugc guucagggc 1140
 cgugaugca ugccaggug auucaggug cccguagua caagaagacu caaggcgcu 1200
 uugguuugu gugggcauug ugagcuggg auuacagugu ggccuccaa auuagccagg 1260
 cguguauacu cgagugacag ccuaccgaa cuggaucaga cagcagcgg gaaucuagug 1320
 caaccgagga aaaaacguc caugaggucu cuguaucaa gugugacuga cucggaugc 1380
 auggcuuac auuuaacug caaaggagac uggaauugcc ccuucugacg uccauuaca 1440
 uaaauugguu uaacuguuua gu 1462

<210> 6

<211> 1462

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

cgccggcag gtcaaagcag ctggacacac agaaacaagg acctcttcat 50
 tattcaagag taaa atg tat agg cca aga cca atg cta tca ccg tca 97

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Met Leu Ser Pro Ser

1

5

10

17/79

aga ttc ttc act ccc ttt gca gta gct ttc gtt gtc ata ata acg 142

Arg Phe Phe Thr Pro Phe Ala Val Ala Phe Val Val Ile Ile Thr

15

20

25

gta ggg ctc ctg gcc atg atg gca ggt cta ctt att cac ttt tta 187

Val Gly Leu Leu Ala Met Met Ala Gly Leu Leu Ile His Phe Leu

30

35

40

gct ttt gac aag aaa gct tac ttt tat cat agc agc ttt caa atc 232

Ala Phe Asp Lys Lys Ala Tyr Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile

45

50

55

cta aac gtt gaa tac act gag gct tta aac tca cca gct aca cac 277

Leu Asn Val Glu Tyr Thr Glu Ala Leu Asn Ser Pro Ala Thr His

60

65

70

gaa tac aga acc ttg agt gaa aga att gag gct atg att act gat 322

Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ala Met Ile Thr Asp

75

80

85

gaa ttt cga gga tca agt cta aaa agt gag ttt atc agg aca cat 367

Glu Phe Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ser Glu Phe Ile Arg Thr His

90

95

100

gtt gtc aaa cta aga aaa gaa ggg act ggt gtg gtt gcg gat gtt 412

Val Val Lys Leu Arg Lys Glu Gly Thr Gly Val Val Ala Asp Val

105

110

115

gtc atg aaa ttt cga tct agt aaa cgt aac aac aga aag gta atg 457

Val Met Lys Phe Arg Ser Ser Lys Arg Asn Asn Arg Lys Val Met

18/79

120 125 130
aaa acc aga att caa tct gtg cta cga aga ctc agc agc tct gga 502
Lys Thr Arg Ile Gln Ser Val Leu Arg Arg Leu Ser Ser Ser Gly
135 140 145

aac ttg gaa ata gcc cct tcg aat gag ata aca tca ctc act gac 547
Asn Leu Glu Ile Ala Pro Ser Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp
150 155 160

cag gat aca gaa aat gtt ttg act caa gaa tgt gga gca cgt cca 592
Gln Asp Thr Glu Asn Val Leu Thr Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro
165 170 175

gac ctt ata aca ctg tca gaa gag aga atc att gga ggc atg caa 637
Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Met Gln
180 185 190

gct gag ccc ggt gac tgg ccc tgg caa gtc agt cta cag ctc aat 682
Ala Glu Pro Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn
195 200 205

aat gtc cac cac tgt gga ggt gcc ctg atc agt aac atg tgg gtc 727
Asn Val His His Cys Gly Gly Ala Leu Ile Ser Asn Met Trp Val
210 215 220

ctg aca gca gct cat tgc ttc aaa agc tat cct aat cct caa tat 772
Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Tyr Pro Asn Pro Gln Tyr
225 230 235

tgg aca gcc acc ttt ggg gtt tct aca atg agc cct agg ctg aga 817

19/79

Trp Thr Ala Thr Phe Gly Val Ser Thr Met Ser Pro Arg Leu Arg

240

245

250

gtg aga gta agg gct att tta gcc cac gac ggg tac agc tcc gta 862

Val Arg Val Arg Ala Ile Leu Ala His Asp Gly Tyr Ser Ser Val

255

260

265

act cgt gac aat gac atc gca gtt gta caa cit gac aga tct gtc 907

Thr Arg Asp Asn Asp Ile Ala Val Val Gln Leu Asp Arg Ser Val

270

275

280

gcc ttt tcc aga aat atc cat agg gta tgt ctc cca gca gca acc 952

Ala Phe Ser Arg Asn Ile His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr

285

290

295

caa aat atc atc cct ggt tct gtc gca tat gtt aca gga tgg gga 997

Gln Asn Ile Ile Pro Gly Ser Val Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly

300

305

310

tct ctc aca tat gga ggc aac gca gtc aca aat cta cgg caa gga 1042

Ser Leu Thr Tyr Gly Gly Asn Ala Val Thr Asn Leu Arg Gln Gly

315

320

325

gag gtc aga ala ata agt tca gag gaa tgc aat acg cca gct ggt 1087

Glu Val Arg Ile Ile Ser Ser Glu Glu Cys Asn Thr Pro Ala Gly

330

335

340

tac agt gga agt gtc ttg cca gga atg ctg tgt gct gga atg cgt 1132

Tyr Ser Gly Ser Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Met Arg

345

350

355

20/79

tca ggg gcc gfg gat gca tgc cag ggt gat tca ggt ggc ccg cta 1177
Ser Gly Ala Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
360 365 370

gta caa gaa gac tca agg cgg ctt tgg ttt gtt gtg ggc att gtg 1222
Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Val Val Gly Ile Val
375 380 385

agc tgg gga tat cag tgt ggc ctc cca aat aag cca ggc gtg tat 1267
Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr
390 395 400

act cga gtg aca gcc tac cgc aac tgg atc aga cag cag acg gga 1312
Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asn Trp Ile Arg Gln Gln Thr Gly
405 410 415

atc tag tgcaaccgag gaaaaaacgt gccatgaggt ctcgtatcc 1358
Ile
417

aagtgtgact gactcggatg ccatggcttc acatttcaac tgcaaaggag 1408
actggaaatg ccccttciga cgtccatta cataaattgg tttactgtt 1458
tagt 1462

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

21/79

<400> 7

aaggatccat ggggccgcgg cggctgct 28

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

tgggaattcc taagtaaca gctttttg 28

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

cctttggatc caggaggatg cggagcccc 29

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

ctgtggaatt cccatctgag gacctggaaa act 33

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cctttggatc catgaaagcc ctcattttg cag 33

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

ccittgaatt cctattttgt aaggtaagca gtgga 35

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

ccttttagatc tatgtggggg cgactgctcc tg 32

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

cctttgaatt ctgtcactgg agcaaagagg a 31

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

tttactgttt tcgtaacagt ttg 24

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

caacaacgca cagaatctag 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

ctgacngcng encaytgctt 20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 18

gtcrccclgr cangcrtc 18

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 19

acgcattcca gcacacagca 20

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 20

cacaaatcta cggcaaggag aggtcag 27

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

gaacttatta ttctgacctc tccttgc 27

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

ggaatgctgt gtgctggaat 20

<210> 23

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 23

ccaaggaatc caaatgtata ggccaagacc aatgctatca c 41

<210> 24

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 24

cctttgaatt cggaacgica gaaggggcat ticcagtct 39

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ile Leu Gly Gly Thr Glu Ala Glu Glu Gly Ser Trp Pro Trp Gln

1

5

10

15

Val Ser Leu Arg Cys

20

<210> 26

<211> 1555

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CDS

<222> (106)... (1359)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (106)... (663)

<220>

28 / 79

<221> trypsin-like protein portion

<222> (664)... (1359)

<400> 26

gttcttttcta gatccacata atacattagt agtcattcat ttgagtggaa atctcagagt 60
 ggtcagatag cagcaaaaag gacagcctca caaticagga ttaaa atg tat agg cca 117

Met Tyr Arg Pro

1

gca aca gta cga tca gct tca aga tct ctg aat cca tac aca gta tgt 165
 Ala Thr Val Arg Ser Ala Ser Arg Ser Leu Asn Pro Tyr Thr Val Cys

5

10

15

20

ttt att gtt gtc gca gtg gig gtg atc ctg gca gtg acc ala gct cta 213
 Phe Ile Val Val Ala Val Val Val Ile Leu Ala Val Thr Ile Ala Leu

25

30

35

ctt gtc cac ttt tta gct ttt gat caa aaa gct tac ttt tac cat agt 261
 Leu Val His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ala Tyr Phe Tyr His Ser

40

45

50

aga ttt caa atc cta aat gtt gaa tat agt gat gag cta aat tca cca 309
 Arg Phe Gln Ile Leu Asn Val Glu Tyr Ser Asp Glu Leu Asn Ser Pro

55

60

65

gct aca cag aaa tat agg tct ttg agt gga aga att gaa tct atg att 357
 Ala Thr Gln Lys Tyr Arg Ser Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Met Ile

70

75

80

act aga aca ttt aag gag tca aat tta aga aat cag ttc gtg aga gct 405
 Thr Arg Thr Phe Lys Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Val Arg Ala

29 / 79

85	90	95	100
cat gtt gtc aaa ctg agg caa agt ggt agt ggt gtg ata gca gat att 453			
His Val Val Lys Leu Arg Gln Ser Gly Ser Gly Val Ile Ala Asp Ile			
105	110	115	
gtc atg aaa ttt aaa ttc acc aga tat aac aat gga gca tca atg aaa 501			
Val Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Tyr Asn Asn Gly Ala Ser Met Lys			
120	125	130	
agc aga att gag tct gtt tta cgc caa atg ctg aat aac act gga aac 549			
Ser Arg Ile Glu Ser Val Leu Arg Gln Met Leu Asn Asn Thr Gly Asn			
135	140	145	
ttg gta atg aac cct tca act gag tta aca cca ata aca gac cag gat 597			
Leu Val Met Asn Pro Ser Thr Glu Leu Thr Pro Ile Thr Asp Gln Asp			
150	155	160	
aca gta aat att ttc act caa gga tgt ggg gcc cgt cca gac cta ata 645			
Thr Val Asn Ile Phe Thr Gln Gly Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu Ile			
165	170	175	180
aca ttg tct gaa gag aga atc ata ggc ggc act aag gct gag gaa gga 693			
Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Thr Lys Ala Glu Glu Gly			
185	190	195	
gac tgg ccc tgg caa gtc agt ctg cag cgg aat aat ctt cat cac tgt 741			
Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Arg Asn Asn Leu His His Cys			
200	205	210	
gga ggc gtc ttg atc agt aac aga tgg atc ctg act gca gct cac tgc 789			

30 / 79

Gly Gly Val Leu Ile Ser Asn Arg Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys
215 220 225

ttc aga agc tac tct gat cct cgc cag tgg act gtc acc ttt ggt att 837
Phe Arg Ser Tyr Ser Asp Pro Arg Gln Trp Thr Val Thr Phe Gly Ile
230 235 240

tcc act ata ttt cct aaa gac aga ata gga gta agg aat att tta atc 885
Ser Thr Ile Phe Pro Lys Asp Arg Ile Gly Val Arg Asn Ile Leu Ile
245 250 255 260

cat aac aat tat aac cct gaa act cat gaa aat gat att gcg ctt gta 933
His Asn Asn Tyr Asn Pro Glu Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Leu Val
265 270 275

caa ctc aac aga gaa gtc gcc ttt acc aaa aat atc cat tca gtg tgt 981
Gln Leu Asn Arg Glu Val Ala Phe Thr Lys Asn Ile His Ser Val Cys
280 285 290

ctc cca gag gcc acc caa act att cca cct ggt tcc acg gct tat gta 1029
Leu Pro Glu Ala Thr Gln Thr Ile Pro Pro Gly Ser Thr Ala Tyr Val
295 300 305

aca gga tgg gga tca caa aga tat agc ggc aac aca gtt cca gat cta 1077
Thr Gly Trp Gly Ser Gln Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Val Pro Asp Leu
310 315 320

gag caa gta cgg gtc aat ata ata agt aac gat gta tgt aat tcg cca 1125
Glu Gln Val Arg Val Asn Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ser Pro
325 330 335 340

31 / 79

gct ggt tat aat ggg gat gtc ctg cct gga atg cta tgt gct ggg cta 1173
Ala Gly Tyr Asn Gly Asp Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Leu
345 350 355

cct gaa ggg gga gca gat gca tgc cag ggt gac tct ggt ggc cca cta 1221
Pro Glu Gly Gly Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
360 365 370

cag cag gag gac tca cgg cgg ctt tgg ttc ctt gtg ggg ata gta agc 1269
Gln Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val Ser
375 380 385

tgg ggg tat cag tgt ggt ctg cca gat aag cca gga gtg tac act cga 1317
Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg
390 395 400

gtg aca gcc tac cgg gac tgg ata gcc caa caa act ggg atc tag caca 1367
Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Ala Gln Gln Thr Gly Ile
405 410 415 418

taaatacacc tctctagcaa gccggtgcac acacatgctc gtctacaatt ccaaacttta 1427
ctttccagcc acaaaagaat acatgtttca caaacactat ttaatcttta ttactatgga 1487
ttttatattc tctcaagaag attlagatga atgttgcatg gtactgtgga tatatgccgg 1547
gggaaaca 1555

<210> 27

<211> 418

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

3 2 / 79

<221> propeptide portion

<222> (1)...(186)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)...(418)

<400> 27

Met	Tyr	Arg	Pro	Ala	Thr	Val	Arg	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Asn
1				5					10					15
Pro	Tyr	Thr	Val	Cys	Phe	Ile	Val	Val	Ala	Val	Val	Val	Ile	Leu
				20					25					30
Ala	Val	Thr	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	His	Phe	Leu	Ala	Phe	Asp	Gln
				35					40					45
Lys	Ala	Tyr	Phe	Tyr	His	Ser	Arg	Phe	Gln	Ile	Leu	Asn	Val	Glu
				50					55					60
Tyr	Ser	Asp	Glu	Leu	Asn	Ser	Pro	Ala	Thr	Gln	Lys	Tyr	Arg	Ser
				65					70					75
Leu	Ser	Gly	Arg	Ile	Glu	Ser	Met	Ile	Thr	Arg	Thr	Phe	Lys	Glu
				80					85					90
Ser	Asn	Leu	Arg	Asn	Gln	Phe	Val	Arg	Ala	His	Val	Val	Lys	Leu
				95					100					105
Arg	Gln	Ser	Gly	Ser	Gly	Val	Ile	Ala	Asp	Ile	Val	Met	Lys	Phe
				110					115					120
Lys	Phe	Thr	Arg	Tyr	Asn	Asn	Gly	Ala	Ser	Met	Lys	Ser	Arg	Ile
				125					130					135
Glu	Ser	Val	Leu	Arg	Gln	Met	Leu	Asn	Asn	Thr	Gly	Asn	Leu	Val
				140					145					150
Met	Asn	Pro	Ser	Thr	Glu	Leu	Thr	Pro	Ile	Thr	Asp	Gln	Asp	Thr
				155					160					165
Val	Asn	Ile	Phe	Thr	Gln	Gly	Cys	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	Leu	Ile

33/79

170	175	180
Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Thr Lys Ala Glu Glu		
185	190	195
Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Arg Asn Asn Leu His		
200	205	210
His Cys Gly Gly Val Leu Ile Ser Asn Arg Trp Ile Leu Thr Ala		
215	220	225
Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asp Pro Arg Gln Trp Thr Val		
230	235	240
Thr Phe Gly Ile Ser Thr Ile Phe Pro Lys Asp Arg Ile Gly Val		
245	250	255
Arg Asn Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Asn Pro Glu Thr His Glu		
260	265	270
Asn Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Asn Arg Glu Val Ala Phe Thr		
275	280	285
Lys Asn Ile His Ser Val Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Thr Ile		
290	295	300
Pro Pro Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Arg		
305	310	315
Tyr Ser Gly Asn Thr Val Pro Asp Leu Glu Gln Val Arg Val Asn		
320	325	330
Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ser Pro Ala Gly Tyr Asn Gly		
335	340	345
Asp Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Leu Pro Glu Gly Gly		
350	355	360
Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Gln Gln Glu		
365	370	375
Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val Ser Trp Gly		
380	385	390
Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val		
395	400	405

34/79

Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Ala Gln Gln Thr Gly Ile

410

415

418

<210> 28

<211> 1520

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<220>

<221> CDS

<222> (100)... (1356)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (100)... (657)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (658)... (1356)

<400> 28

aactatagat ccacgtaata catgagagtc attcatttga gtgggaatcY caaagcagtt 60

gagtaggcag aaaaaggagc ctcctcatta aggatlaaa atg tat agg cca gca 114

Met Tyr Arg Pro Ala

1

5

cgt gla cca tcg act tca aga ttt ctg aat cca tat gtc gla tgt ttc 162

Arg Val Pro Ser Thr Ser Arg Phe Leu Asn Pro Tyr Val Val Cys Phe

10

15

20

att gtc gtc gca ggg gla gtg atc ctg gca gtg acc ata gct cta ctt 210

35/79

Ile Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu Ala Val Thr Ile Ala Leu Leu
 25 30 35

gtt tac ttt tta gct ttt gat caa aaa tct tac ttt tac agg agc agt 258
 Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr Phe Tyr Arg Ser Ser
 40 45 50

ttt caa ctc cta aat gtt gaa tat aat agt cag tta aat tca cca gct 306
 Phe Gln Leu Leu Asn Val Glu Tyr Asn Ser Gln Leu Asn Ser Pro Ala
 55 60 65

aca cag gaa tac agg act ttg agt gga aga att gaa tct ctg att act 354
 Thr Gln Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Leu Ile Thr
 70 75 80 85

aga aca ttc aaa gaa tca aat tta aga aac cag ttc atg aga gct cat 402
 Arg Thr Phe Lys Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Met Arg Ala His
 90 95 100

gtt gtc aaa ctg agt caa gat ggt agt ggt gtg aga gcg gat gtt gtc 450
 Val Val Lys Leu Ser Gln Asp Gly Ser Gly Val Arg Ala Asp Val Val
 105 110 115

atg aaa ttt cga ttc act aga aat aac aat gga gca tca atg aaa agc 498
 Met Lys Phe Arg Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly Ala Ser Met Lys Ser
 120 125 130

aga att gag tct gtt tta caa caa atg ctg aat aac tct gga aat ttg 546
 Arg Ile Glu Ser Val Leu Gln Gln Met Leu Asn Asn Ser Gly Asn Leu
 135 140 145

36 / 79

gaa ata aac tct tca act gag ata aca tca ctt act gac cag gct gca 594
Glu Ile Asn Ser Ser Thr Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp Gln Ala Ala
150 155 160 165

gca aat tgg ctt att aaY gaa tgt ggg gcc ggt cca gac cta ata aca 642
Ala Asn Trp Leu Ile Xaa Glu Cys Gly Ala Gly Pro Asp Leu Ile Thr
170 175 180

tig tct gag cag aga atc att gga ggc act gag gct gag gag gga agc 690
Leu Ser Glu Gln Arg Ile Ile Gly Gly Thr Glu Ala Glu Glu Gly Ser
185 190 195

tgg cca tgg caa gtc agt cta cgg gta aat aat gcc cac cac tgt gga 738
Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Val Asn Asn Ala His His Cys Gly
200 205 210

ggc agc ctg atc agt aac acg tgg atc ctg aca gca gct cac tgc ttc 786
Gly Ser Leu Ile Ser Asn Thr Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe
215 220 225

aga agc aac tcc aat cct cgt gaa tgg att gcc acc ttt ggt att tcc 834
Arg Ser Asn Ser Asn Pro Arg Glu Trp Ile Ala Thr Phe Gly Ile Ser
230 235 240 245

aca aca aat cct aga cta aga atg aga gta aga agt att tta att cat 882
Thr Thr Asn Pro Arg Leu Arg Met Arg Val Arg Ser Ile Leu Ile His
250 255 260

aac aat tat ata tct gca act cat gaa aat gac att gca ctt gtg aga 930
Asn Asn Tyr Ile Ser Ala Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Leu Val Arg
265 270 275

37 / 79

ctt gag aac agt gtc acc ttt acc aga gac atc cat agt gtg tgt ctc 978

Leu Glu Asn Ser Val Thr Phe Thr Arg Asp Ile His Ser Val Cys Leu

280

285

290

cca gct gct acc cag aat att cca ctt ggc tct act gct tat gta aca 1026

Pro Ala Ala Thr Gln Asn Ile Pro Leu Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr

295

300

305

gga tgg ggt gct caa gaa tat gcc ggc tcc aca gtt tca gag cta agg 1074

Gly Trp Gly Ala Gln Glu Tyr Ala Gly Ser Thr Val Ser Glu Leu Arg

310

315

320

325

caa gca caa gtc aga ata ata agt aat gat gta tgt aat gca cca tat 1122

Gln Ala Gln Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ala Pro Tyr

330

335

340

agt tat aat gga ggc atc ttg ccc gga atg cta tgt gct gga gta cct 1170

Ser Tyr Asn Gly Gly Ile Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Val Pro

345

350

355

caa ggt gga gtg gat gca tgt cag ggt gac tct ggt ggc ccc cta gta 1218

Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val

360

365

370

cag gaa gac tca cgg cgg ctt tgg ttt ctt gtg ggg ata gta agc tgg 1266

Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val Ser Trp

375

380

385

gga gat cag tgt ggc ctg cca gat agg cca gga gtg tat acc cga gtg 1314

Gly Asp Gln Cys Gly Leu Pro Asp Arg Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val

38/79

390

395

400

405

aca acc tac cga gac tgg att agg caa cga act ggg atc tag tgcaccaag 1365

Thr Thr Tyr Arg Asp Trp Ile Arg Gln Arg Thr Gly Ile

410

415

418

tgcatcccg ttgcaaagtc tgtatgcggg tgtgcctgtc ttaaattcca aagcittaca 1425

tttcaaccga aaaagaaact ggaaalgicc taatttaaca acttggttaca taaacatggt 1485

ttaataataa taataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1520

<210> 29

<211> 418

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)... (186)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)... (418)

<400> 29

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Pro Ser Thr Ser Arg Phe Leu Asn Pro

1

5

10

15

Tyr Val Val Cys Phe Ile Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu Ala Val

20

25

30

Thr Ile Ala Leu Leu Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr

35

40

45

Phe Tyr Arg Ser Ser Phe Gln Leu Leu Asn Val Glu Tyr Asn Ser Gln

39 / 79

50 55 60
 Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile
 65 70 75 80
 Glu Ser Leu Ile Thr Arg Thr Phe Lys Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln
 85 90 95
 Phe Met Arg Ala His Val Val Lys Leu Ser Gln Asp Gly Ser Gly Val
 100 105 110
 Arg Ala Asp Val Val Met Lys Phe Arg Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly
 115 120 125
 Ala Ser Met Lys Ser Arg Ile Glu Ser Val Leu Gln Gln Met Leu Asn
 130 135 140
 Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Asn Ser Ser Thr Glu Ile Thr Ser Leu
 145 150 155 160
 Thr Asp Gln Ala Ala Ala Asn Trp Leu Ile Asn Glu Cys Gly Ala Gly
 165 170 175
 Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Gln Arg Ile Ile Gly Gly Thr Glu
 180 185 190
 Ala Glu Glu Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Val Asn Asn
 195 200 205
 Ala His His Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Asn Thr Trp Ile Leu Thr
 210 215 220
 Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Asn Ser Asn Pro Arg Glu Trp Ile Ala
 225 230 235 240
 Thr Phe Gly Ile Ser Thr Thr Asn Pro Arg Leu Arg Met Arg Val Arg
 245 250 255
 Ser Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Ile Ser Ala Thr His Glu Asn Asp
 260 265 270
 Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Asn Ser Val Thr Phe Thr Arg Asp Ile
 275 280 285
 His Ser Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Asn Ile Pro Leu Gly Ser
 290 295 300

40/79

Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ala Gln Glu Tyr Ala Gly Ser Thr
305 310 315 320
Val Ser Glu Leu Arg Gln Ala Gln Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val
325 330 335
Cys Asn Ala Pro Tyr Ser Tyr Asn Gly Gly Ile Leu Pro Gly Met Leu
340 345 350
Cys Ala Gly Val Pro Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser
355 360 365
Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val
370 375 380
Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Gln Cys Gly Leu Pro Asp Arg Pro Gly
385 390 395 400
Val Tyr Thr Arg Val Thr Thr Tyr Arg Asp Trp Ile Arg Gln Arg Thr
405 410 415
Gly Ile
418

<210> 30

<211> 1406

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<220>

<221> CDS

<222> (110)... (1366)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (110)... (667)

<220>

41/79

<221> trypsin-like protein portion

<222> (668)... (1366)

<400> 30

gagttccttc atagatcaca cataatatat gagagtcatt catttgigta gaaatctcag 60
 agaagttaga taggcagcag aaaggatctc ttcattattc aggalcaaa atg tat agg 118

Met Tyr Arg

1

cca gca cgg gtg cca tca ggc tca aga ttc ctg aat cca tat gta gtg 166
 Pro Ala Arg Val Pro Ser Gly Ser Arg Phe Leu Asn Pro Tyr Val Val

5

10

15

tgt ttc gtt gtt gtg gca ggg gtg gta atc ctg gcc gta acc ata gct 214
 Cys Phe Val Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu Ala Val Thr Ile Ala

20

25

30

35

cta ctc atc cac ttc tta gcg ttt gat caa aag tct tac ttt tac cat 262
 Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr Phe Tyr His

40

45

50

agc agt ttt caa atc cia aat gtc caa tat agt aat caa tta aat tca 310
 Ser Ser Phe Gln Ile Leu Asn Val Gln Tyr Ser Asn Gln Leu Asn Ser

55

60

65

cca ggg aca caa gaa tac agg act ttg agt gga aga att gaa tct ctg 358
 Pro Gly Thr Gln Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Leu

70

75

80

att act aaa aca ttc aga gaa tca aat tta aga aat cag ttc atc aga 406
 Ile Thr Lys Thr Phe Arg Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Ile Arg

42/79

85

90

95

gct cat gtt gtc aaa ctg agg caa gaa ggt aat ggt gtg ata gca gat 454

Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Glu Gly Asn Gly Val Ile Ala Asp

100

105

110

115

gtt gtc atg aaa ttt aaa ttc act aga aat aac aat gga gca ttg atg 502

Val Val Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly Ala Leu Met

120

125

130

aaa agc aga att aag tct gtt tta cac caa atg ctg aat aat tct gga 550

Lys Ser Arg Ile Lys Ser Val Leu His Gln Met Leu Asn Asn Ser Gly

135

140

145

aac ttg gaa ala agc cct tca act gag ata aca tcc att act gac cag 598

Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ser Thr Glu Ile Thr Ser Ile Thr Asp Gln

150

155

160

gat aca gla aat att ttc act gaa gga tgt ggg gcc cgt cca gac cta 646

Asp Thr Val Asn Ile Phe Thr Glu Gly Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu

165

170

175

ata act ttg tct gag gag agg atc cta gga ggc aac aag gct gaa gaa 694

Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Leu Gly Gly Asn Lys Ala Glu Glu

180

185

190

195

gga gat tgg cca tgg caa gtc agt cta cag aag aat aat gtt cac cac 742

Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Lys Asn Asn Val His His

200

205

210

tgt gga ggt gtc ctg atc agt agc atg tgg atc ctg tca gca gct cac 790

43 / 79

Cys Gly Gly Val Leu Ile Ser Ser Met Trp Ile Leu Ser Ala Ala His

215

220

225

tgc ttc aga agc caa tct aat cct cgt cag tgg act gcc atc ttt ggt 838

Cys Phe Arg Ser Gln Ser Asn Pro Arg Gln Trp Thr Ala Ile Phe Gly

230

235

240

gct tca ata gca ttt cct aaa cag aaa aga aga gta agg act att tta 886

Ala Ser Ile Ala Phe Pro Lys Gln Lys Arg Arg Val Arg Thr Ile Leu

245

250

255

atc cat aac aat tat aac cct gca act cat gaa aat gat att gca gct 934

Ile His Asn Asn Tyr Asn Pro Ala Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Ala

260

265

270

275

ata caa ctt gaa gga ggt atc aac ttt acc aaa aat atc cat agg gtg 982

Ile Gln Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Thr Lys Asn Ile His Arg Val

280

285

290

tgt ctc cca gag gct acc cag aat att cca cct ggt tct tct gct tat 1030

Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Asn Ile Pro Pro Gly Ser Ser Ala Tyr

295

300

305

gta aca gga tgg gga tct caa gaa tac ggt ggt aac aca gtt tca gat 1078

Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Glu Tyr Gly Gly Asn Thr Val Ser Asp

310

315

320

cta cag caa gca cgg gtc aga ata ata agt aat gat gta tgt aat gca 1126

Leu Gln Gln Ala Arg Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ala

325

330

335

44/79

cca act agt tat aac gga gct gtc agg cct gga atg ctc tgt gct ggc 1174

Pro Thr Ser Tyr Asn Gly Ala Val Arg Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly

340 345 350 355

cta cct caa ggt gga gtg gat gca tgc cgg ggt gac tcg ggt ggc cca 1222

Leu Pro Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro

360 365 370

ctg gtt caa gag gac tca cgg cgg ctt tgg ttc ctc gtg gga ata gta 1270

Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val

375 380 385

agc tgg ggg gac cga tgc ggt ctg cca gat aag cca gga gtg tac act 1318

Ser Trp Gly Asp Arg Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr

390 395 400

cga gtg aca gcc tac cgt gac tgg ata act gaa aaa act gga gtc tag c 1367

Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Thr Glu Lys Thr Gly Val

405 410 415 418

acaataaatg catctttgtg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1406

<210> 31

<211> 418

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)... (186)

45 / 79

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)... (418)

<400> 31

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Pro Ser Gly Ser Arg Phe Leu Asn Pro

1 5 10 15

Tyr Val Val Cys Phe Val Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu Ala Val

20 25 30

Thr Ile Ala Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr

35 40 45

Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile Leu Asn Val Gln Tyr Ser Asn Gln

50 55 60

Leu Asn Ser Pro Gly Thr Gln Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile

65 70 75 80

Glu Ser Leu Ile Thr Lys Thr Phe Arg Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln

85 90 95

Phe Ile Arg Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Glu Gly Asn Gly Val

100 105 110

Ile Ala Asp Val Val Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly

115 120 125

Ala Leu Met Lys Ser Arg Ile Lys Ser Val Leu His Gln Met Leu Asn

130 135 140

Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ser Thr Glu Ile Thr Ser Ile

145 150 155 160

Thr Asp Gln Asp Thr Val Asn Ile Phe Thr Glu Gly Cys Gly Ala Arg

165 170 175

Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Leu Gly Gly Asn Lys

180 185 190

Ala Glu Glu Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Lys Asn Asn

195 200 205

46/79

Val His His Cys Gly Gly Val Leu Ile Ser Ser Met Trp Ile Leu Ser
 210 215 220
 Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Gln Ser Asn Pro Arg Gln Trp Thr Ala
 225 230 235 240
 Ile Phe Gly Ala Ser Ile Ala Phe Pro Lys Gln Lys Arg Arg Val Arg
 245 250 255
 Thr Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Asn Pro Ala Thr His Glu Asn Asp
 260 265 270
 Ile Ala Ala Ile Gln Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Thr Lys Asn Ile
 275 280 285
 His Arg Val Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Asn Ile Pro Pro Gly Ser
 290 295 300
 Ser Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Glu Tyr Gly Gly Asn Thr
 305 310 315 320
 Val Ser Asp Leu Gln Gln Ala Arg Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val
 325 330 335
 Cys Asn Ala Pro Thr Ser Tyr Asn Gly Ala Val Arg Pro Gly Met Leu
 340 345 350
 Cys Ala Gly Leu Pro Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Arg Gly Asp Ser
 355 360 365
 Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val
 370 375 380
 Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Arg Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly
 385 390 395 400
 Val Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Thr Glu Lys Thr
 405 410 415
 Gly Val
 418

<210> 32

<211> 1381

47 / 79

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

<222> (73)... (1326)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (73)... (627)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (628)... (1326)

<400> 32

gggattcatt tgagtggaat tctcagagca gtgcatagg cggaataaag gacitcatta 60
 ttaaggatta aa atg tat agg cca gca cga gtg aca tca gcc tca aga tcc 111
 Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Thr Ser Ala Ser Arg Ser

1

5

10

ctg aat cca tat cta gta ttt ttt gtt gtc gtc gca gtg gtg gtg atc 159
 Leu Asn Pro Tyr Leu Val Phe Phe Val Val Val Ala Val Val Val Ile

15

20

25

ctg gca gtg atc ata ggt cta ctt gtc tac ttt tta gct ttt gat caa 207
 Leu Ala Val Ile Ile Gly Leu Leu Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln

30

35

40

45

aaa tct tac ttt tac caa agc agc att caa atc ttg ggt aaa caa tat 255
 Lys Ser Tyr Phe Tyr Gln Ser Ser Ile Gln Ile Leu Gly Lys Gln Tyr

48/79

50

55

60

agt gat gag tta agt tca cca gct aca gag aaa tat agg act ttg agt 303
Ser Asp Glu Leu Ser Ser Pro Ala Thr Glu Lys Tyr Arg Thr Leu Ser

65

70

75

gga aga att gaa tct atg att act aaa aca ttc aaa gag tca gat tta 351
Gly Arg Ile Glu Ser Met Ile Thr Lys Thr Phe Lys Glu Ser Asp Leu

80

85

90

aaa aat gag ttc atc aaa gct cat gtt gtc aaa ctg agg caa agt ggc 399
Lys Asn Glu Phe Ile Lys Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Ser Gly

95

100

105

aat aat gig ata gca gat att atc atg aaa ttt aaa ttc acc aga aga 447
Asn Asn Val Ile Ala Asp Ile Ile Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Arg

110

115

120

125

atc aat gaa gca tca atg aaa agc aga att gag tct att tta cgc caa 495
Ile Asn Glu Ala Ser Met Lys Ser Arg Ile Glu Ser Ile Leu Arg Gln

130

135

140

atg ccg aat aac tct gaa gac ttg aac atg aat cca act cag gta ata 543
Met Pro Asn Asn Ser Glu Asp Leu Asn Met Asn Pro Thr Gln Val Ile

145

150

155

tca ata act ggc cag gat aca ata caa ctg ttc act cga gaa tgt ggg 591
Ser Ile Thr Gly Gln Asp Thr Ile Gln Leu Phe Thr Arg Glu Cys Gly

160

165

170

gtc cgc tca gac ctg ata acc ttg tct gag gag aga atc ata gga ggc 639

49 / 79

Val Arg Ser Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly

175

180

185

agt aaa gct gag aaa gga gac tgg cca tgg caa gtc agt cta cag tgg 687

Ser Lys Ala Glu Lys Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Trp

190

195

200

205

agc agt tct cac cgc tgc gga gga gcc ttg atc agt aat agg tgg atc 735

Ser Ser Ser His Arg Cys Gly Gly Ala Leu Ile Ser Asn Arg Trp Ile

210

215

220

ctg tca gca gct cac tgc ttc aga agc cac tct gat cct cgc caa tgg 783

Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Arg Ser His Ser Asp Pro Arg Gln Trp

225

230

235

att gcc acc ttt ggt act tcc aca ata tct cct caa ctg aga gta gga 831

Ile Ala Thr Phe Gly Thr Ser Thr Ile Ser Pro Gln Leu Arg Val Gly

240

245

250

gta agg aat att tta atc cat gac aat tat aaa cct gaa act cat gaa 879

Val Arg Asn Ile Leu Ile His Asp Asn Tyr Lys Pro Glu Thr His Glu

255

260

265

aac gat att gca ctc gta caa ctt gat aga gaa gtc acc ttt aac aga 927

Asn Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Asp Arg Glu Val Thr Phe Asn Arg

270

275

280

285

tat att cat aca gtg tgt ctc cca gag gct aac cag gcc att tca gct 975

Tyr Ile His Thr Val Cys Leu Pro Glu Ala Asn Gln Ala Ile Ser Ala

290

295

300

50/79

ggc tcc act gct tat gta aca gga tgg gga tct cag agt tat agc ggc 1023

Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Ser Tyr Ser Gly

305

310

315

agc aca gtt tca gat cta aac caa gga cgg gtc aat ata ata agt aat 1071

Ser Thr Val Ser Asp Leu Asn Gln Gly Arg Val Asn Ile Ile Ser Asn

320

325

330

act gta tgt aac aca cca gct ggt tat aat gga gcc gtc ctg tct gga 1119

Thr Val Cys Asn Thr Pro Ala Gly Tyr Asn Gly Ala Val Leu Ser Gly

335

340

345

atg cta tgt gct gga cta cct gaa ggt gga gtg gac gcg tgc cag ggt 1167

Met Leu Cys Ala Gly Leu Pro Glu Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly

350

355

360

365

gac tct ggt ggc cct cta gta caa gaa gac tca cgg caa cac tgg ttc 1215

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Gln His Trp Phe

370

375

380

atc gtg ggg ata gta agc tgg ggg tat caa tgt ggt ctg cca gat aaa 1263

Ile Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys

385

390

395

cca gga gta tac act aga gtg aca gcc tac cgt gac tgg ata acc caa 1311

Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Thr Gln

400

405

410

caa act ggt atc tag tgcaataaat acatcttggc tcaagagcca aaaaaaaaaa 1367

Gln Thr Gly Ile

415

417

51/79

aaaaaaaaaa aaaa 1381

<210> 33

<211> 417

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)...(185)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (186)...(417)

<400> 33

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Thr Ser Ala Ser Arg Ser Leu Asn Pro

1 5 10 15

Tyr Leu Val Phe Phe Val Val Val Ala Val Val Val Ile Leu Ala Val

20 25 30

Ile Ile Gly Leu Leu Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr

35 40 45

Phe Tyr Gln Ser Ser Ile Gln Ile Leu Gly Lys Gln Tyr Ser Asp Glu

50 55 60

Leu Ser Ser Pro Ala Thr Glu Lys Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile

65 70 75 80

Glu Ser Met Ile Thr Lys Thr Phe Lys Glu Ser Asp Leu Lys Asn Glu

85 90 95

Phe Ile Lys Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Ser Gly Asn Asn Val

100 105 110

52/79

Ile Ala Asp Ile Ile Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Arg Ile Asn Glu
115 120 125
Ala Ser Met Lys Ser Arg Ile Glu Ser Ile Leu Arg Gln Met Pro Asn
130 135 140
Asn Ser Glu Asp Leu Asn Met Asn Pro Thr Gln Val Ile Ser Ile Thr
145 150 155 160
Gly Gln Asp Thr Ile Gln Leu Phe Thr Arg Glu Cys Gly Val Arg Ser
165 170 175
Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Ser Lys Ala
180 185 190
Glu Lys Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Trp Ser Ser Ser
195 200 205
His Arg Cys Gly Gly Ala Leu Ile Ser Asn Arg Trp Ile Leu Ser Ala
210 215 220
Ala His Cys Phe Arg Ser His Ser Asp Pro Arg Gln Trp Ile Ala Thr
225 230 235 240
Phe Gly Thr Ser Thr Ile Ser Pro Gln Leu Arg Val Gly Val Arg Asn
245 250 255
Ile Leu Ile His Asp Asn Tyr Lys Pro Glu Thr His Glu Asn Asp Ile
260 265 270
Ala Leu Val Gln Leu Asp Arg Glu Val Thr Phe Asn Arg Tyr Ile His
275 280 285
Thr Val Cys Leu Pro Glu Ala Asn Gln Ala Ile Ser Ala Gly Ser Thr
290 295 300
Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Val
305 310 315 320
Ser Asp Leu Asn Gln Gly Arg Val Asn Ile Ile Ser Asn Thr Val Cys
325 330 335
Asn Thr Pro Ala Gly Tyr Asn Gly Ala Val Leu Ser Gly Met Leu Cys
340 345 350
Ala Gly Leu Pro Glu Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly

53/79

355 360 365
 Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Gln His Trp Phe Ile Val Gly
 370 375 380
 Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val
 385 390 395 400
 Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Thr Gln Gln Thr Gly
 405 410 415
 Ile
 417

<210> 34

<211> 1419

<212> DNA

<213> Oryctolagus cuniculus

<220>

<221> CDS

<222> (73)... (1329)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (73)... (630)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (631)... (1329)

<400> 34

gtcacttgag tgggaatctc aaagcagttg gattggcaga aaaataggac ctcttcgcta 60
 ctcaggatta aa atg tat agg cca gca cgg gga tca tcg act tca aga ttc 111
 Met Tyr Arg Pro Ala Arg Gly Ser Ser Thr Ser Arg Phe

54/79

1

5

10

ctg aat cca tac gtg att tgt ttc att gtt gia gca gtc gtg gtg atc 159

Leu Asn Pro Tyr Val Ile Cys Phe Ile Val Val Ala Val Val Val Ile

15

20

25

ctg gca gtg atc gia gct cta ctt att cac ttt tta gct ttt gat aaa 207

Leu Ala Val Ile Val Ala Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Lys

30

35

40

45

aag tct tgc ttt ttt cac agc agc ttt caa att cga aat gtt caa tat 255

Lys Ser Cys Phe Phe His Ser Ser Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Tyr

50

55

60

agc gat cag tta aat tca cca gct aca cag gaa tac aga tta ttg agt 303

Ser Asp Gln Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Leu Ser

65

70

75

gaa aga att gaa tct atg att agt caa aca cta caa gga tca aac tta 351

Glu Arg Ile Glu Ser Met Ile Ser Gln Thr Leu Gln Gly Ser Asn Leu

80

85

90

aga aat cag ttc att aga gct cat gtt gtc aaa ctg agg cag gat agt 399

Arg Asn Gln Phe Ile Arg Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Asp Ser

95

100

105

aat agt gtg ata gca gat gtt gia atg aaa ttc cga gtc agt aga aac 447

Asn Ser Val Ile Ala Asp Val Val Met Lys Phe Arg Val Ser Arg Asn

110

115

120

125

aac aat ggt gat gca atg aaa aga agg gtt cag gat gtt tta cag caa 495

55 / 79

Asn Asn Gly Asp Ala Met Lys Arg Arg Val Gln Asp Val Leu Gln Gln

130

135

140

atg ctg aat aac tct gga agc ttg gaa ata aac cct tca act acg gta 543

Met Leu Asn Asn Ser Gly Ser Leu Glu Ile Asn Pro Ser Thr Thr Val

145

150

155

aca gag att act ggc cag gat aca gaa act atc ttc acc caa caa tgt 591

Thr Glu Ile Thr Gly Gln Asp Thr Glu Thr Ile Phe Thr Gln Gln Cys

160

165

170

ggg gcc cgt cca gac cta ata aca ttg tct gaa gag aga atc att gga 639

Gly Ala Arg Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly

175

180

185

ggc acc cag gct gag gag gga gac tgg ccc tgg caa gtc agt ctc cag 687

Gly Thr Gln Ala Glu Glu Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln

190

195

200

205

ccc aac aat gct cac cat tgt gga ggc att ttg atc agt aac acg tgg 735

Pro Asn Asn Ala His His Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Asn Thr Trp

210

215

220

atc ctg aca gca gca cac tgc ttc cgg agc tac tct gat cct cgt caa 783

Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asp Pro Arg Gln

225

230

235

tgg act gcc acc ttt ggt att tcc aca gca gtt tct aga cag aga atg 831

Trp Thr Ala Thr Phe Gly Ile Ser Thr Ala Val Ser Arg Gln Arg Met

240

245

250

56 / 79

aga ata agg aca att tta gtc cat aac aat tat aga tct gca acg cat 879
 Arg Ile Arg Thr Ile Leu Val His Asn Asn Tyr Arg Ser Ala Thr His
 255 260 265

gaa aat gat att gca gct gtg caa ctt gaa gga gct atc aca ttt aca 927
 Glu Asn Asp Ile Ala Ala Val Gln Leu Glu Gly Ala Ile Thr Phe Thr
 270 275 280 285

aga aac atc cat agt gtg tgt ctc cca gag gcc act cag aac att aca 975
 Arg Asn Ile His Ser Val Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Asn Ile Thr
 290 295 300

ccg ggt tct tca gct tat gta aca gga tgg ggg tct cta gaa tat ggt 1023
 Pro Gly Ser Ser Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu Glu Tyr Gly
 305 310 315

ggc aac acg gtt acc tat cta cag caa gga cgg gtc aga ata ata agt 1071
 Gly Asn Thr Val Thr Tyr Leu Gln Gln Gly Arg Val Arg Ile Ile Ser
 320 325 330

aat gaa gta tgt aac gca cca gcg agt tac aat ggc gct gtc ttg cct 1119
 Asn Glu Val Cys Asn Ala Pro Ala Ser Tyr Asn Gly Ala Val Leu Pro
 335 340 345

aca atg gtg tgt gca gga tta tct caa gga gga gtg gac gca tgc cag 1167
 Thr Met Val Cys Ala Gly Leu Ser Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln
 350 355 360 365

ggt gac tct ggt ggc cca ctg gta caa gaa gac tcg cgc cgg ctt tgg 1215
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp
 370 375 380

57/79

ttc gtt gtc ggc att gta agc tgg ggc tat cag tgt ggc ctg cct gac 1263
 Phe Val Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp

385

390

395

aaa cca gga gtc tac aca cga gtc aca gcc tac cgt gac tgg att aga 1311
 Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Arg

400

405

410

gaa caa acg ggg atc tag ctggataaat gcacctctgc tgcaaagccg gttcgcaa 1367
 Glu Gln Thr Gly Ile

415

418

ctgagcctgt caaaaatcca agctttaatt ctccgctgaa aagaacagga ag 1419

<210> 35

<211> 418

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)... (186)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)... (418)

<400> 35

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Gly Ser Ser Thr Ser Arg Phe Leu Asn Pro

1

5

10

15

58/79

Tyr Val Ile Cys Phe Ile Val Val Ala Val Val Val Ile Leu Ala Val
 20 25 30
 Ile Val Ala Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Lys Lys Ser Cys
 35 40 45
 Phe Phe His Ser Ser Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Tyr Ser Asp Gln
 50 55 60
 Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Leu Ser Glu Arg Ile
 65 70 75 80
 Glu Ser Met Ile Ser Gln Thr Leu Gln Gly Ser Asn Leu Arg Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ile Arg Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Asp Ser Asn Ser Val
 100 105 110
 Ile Ala Asp Val Val Met Lys Phe Arg Val Ser Arg Asn Asn Asn Gly
 115 120 125
 Asp Ala Met Lys Arg Arg Val Gln Asp Val Leu Gln Gln Met Leu Asn
 130 135 140
 Asn Ser Gly Ser Leu Glu Ile Asn Pro Ser Thr Thr Val Thr Glu Ile
 145 150 155 160
 Thr Gly Gln Asp Thr Glu Thr Ile Phe Thr Gln Gln Cys Gly Ala Arg
 165 170 175
 Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Thr Gln
 180 185 190
 Ala Glu Glu Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Pro Asn Asn
 195 200 205
 Ala His His Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Asn Thr Trp Ile Leu Thr
 210 215 220
 Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asp Pro Arg Gln Trp Thr Ala
 225 230 235 240
 Thr Phe Gly Ile Ser Thr Ala Val Ser Arg Gln Arg Met Arg Ile Arg
 245 250 255
 Thr Ile Leu Val His Asn Asn Tyr Arg Ser Ala Thr His Glu Asn Asp

260	265	270	
Ile Ala Ala Val Gln Leu Glu Gly Ala Ile Thr Phe Thr Arg Asn Ile			
275	280	285	
His Ser Val Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Asn Ile Thr Pro Gly Ser			
290	295	300	
Ser Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu Glu Tyr Gly Gly Asn Thr			
305	310	315	320
Val Thr Tyr Leu Gln Gln Gly Arg Val Arg Ile Ile Ser Asn Glu Val			
325	330	335	
Cys Asn Ala Pro Ala Ser Tyr Asn Gly Ala Val Leu Pro Thr Met Val			
340	345	350	
Cys Ala Gly Leu Ser Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser			
355	360	365	
Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Val Val			
370	375	380	
Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly			
385	390	395	400
Val Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Arg Glu Gln Thr			
405	410	415	
Gly Ile			
418			

<210> 36

<211> 1576

<212> DNA

<213> Cavia porcellus

<220>

<221> CDS

<222> (102)... (1358)

60/79

<220>

<221> propeptide portion

<222> (102)... (659)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (660)... (1358)

<400> 36

ggacttcgc tcctcagaca ctcagcactc cagtcatttc agtgggaatc tcaaaggagt 60
 tgacaagcag gagaacgac gcttcattct tcaggataaa g atg tat agg cca gca 116

Met Tyr Arg Pro Ala

1

5

aca gtg tca tct aac tcg aga ttc ctg aac ccc tgg gta gtc ttc ttc 164

Thr Val Ser Ser Asn Ser Arg Phe Leu Asn Pro Trp Val Val Phe Phe

10

15

20

act gtg ttc gcg gtg gtg ggg atc ctg gcc atg att gta gga ctg ctc 212

Thr Val Phe Ala Val Val Gly Ile Leu Ala Met Ile Val Gly Leu Leu

25

30

35

att cac ttt tta gct ttt gat caa aaa tct tgc ttt tac cac agt gat 260

Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Cys Phe Tyr His Ser Asp

40

45

50

gtt caa ata atg aat gtt gaa tac aat gat cag tta agc tca ccc ggt 308

Val Gln Ile Met Asn Val Glu Tyr Asn Asp Gln Leu Ser Ser Pro Gly

55

60

65

aca caa gaa tac agg att ttg agt gaa agg att gaa tct atg atc act 356

61 / 79

Thr Gln Glu Tyr Arg Ile Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ser Met Ile Thr
70 75 80 85

aat gca ttc cag cag tcc aat tta aga aat cag ttt atc aga gcc cat 404
Asn Ala Phe Gln Gln Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Ile Arg Ala His
90 95 100

ggt gta aga ctg agg caa gag ggt aac ggt glg gia gca gat gtt gtc 452
Val Val Arg Leu Arg Gln Glu Gly Asn Gly Val Val Ala Asp Val Val
105 110 115

atg aag ttt cga ttc agt aga cgt aac aat gga gaa tcc atg aaa gcc 500
Met Lys Phe Arg Phe Ser Arg Arg Asn Asn Gly Glu Ser Met Lys Ala
120 125 130

aga att cag tct att tta cag caa atg ctg aat aac tct gga aac ctg 548
Arg Ile Gln Ser Ile Leu Gln Gln Met Leu Asn Asn Ser Gly Asn Leu
135 140 145

gaa ala agc cct tca gcc ggg gta aca gaa att aac gac cag gaa aca 596
Glu Ile Ser Pro Ser Ala Gly Val Thr Glu Ile Asn Asp Gln Glu Thr
150 155 160 165

gaa aat atg ttt act caa gca tgc ggg gcc cgt cca gac ctg atg acg 644
Glu Asn Met Phe Thr Gln Ala Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu Met Thr
170 175 180

ctg tct gca gag aga gtc gtt gga ggt act caa gct gac cag ggc gac 692
Leu Ser Ala Glu Arg Val Val Gly Gly Thr Gln Ala Asp Gln Gly Asp
185 190 195

6 2 / 7 9

tgg ccg tgg caa gtc agt ctg cag gtc aac ggt ggc cat cgc tgc gga 740

Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Val Asn Gly Gly His Arg Cys Gly

200

205

210

ggc gtc ctg gtc agc aac cag tgg gtc ctg act gca gcc cac tgc ttc 788

Gly Val Leu Val Ser Asn Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe

215

220

225

aga agc tac cct aat gct caa caa tgg act gcc acc ttt ggt att tcc 836

Arg Ser Tyr Pro Asn Ala Gln Gln Trp Thr Ala Thr Phe Gly Ile Ser

230

235

240

245

aca acc tct cct act ctg aga gtg aga gtg agg act att tca atc cac 884

Thr Thr Ser Pro Thr Leu Arg Val Arg Val Arg Thr Ile Ser Ile His

250

255

260

aac aat tac aat cct gtg act cat gag aat gat att gca gct gtg cag 932

Asn Asn Tyr Asn Pro Val Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Ala Val Gln

265

270

275

ctg gaa agg gct gtc acc ttc acc agg gat gtt cac cga gta tgi ctc 980

Leu Glu Arg Ala Val Thr Phe Thr Arg Asp Val His Arg Val Cys Leu

280

285

290

ccc gca gcc acc cag act gtc aca cct ggt tct aca gct tat gta aca 1028

Pro Ala Ala Thr Gln Thr Val Thr Pro Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr

295

300

305

gga tgg ggc tcg ata atc tat ggt ggc aac acg gtc aga tat cta cgg 1076

Gly Trp Gly Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Asn Thr Val Arg Tyr Leu Arg

310

315

320

325

63/79

caa gga caa gtc cag ata ala agt act agt gag tgt aac gca cca gcc 1124
Gln Gly Gln Val Gln Ile Ile Ser Thr Ser Glu Cys Asn Ala Pro Ala
330 335 340

agt tac aac ggt gct gtc ctg cct ggg atg ctg tgt gct ggc gtg ccg 1172
Ser Tyr Asn Gly Ala Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Val Pro
345 350 355

aca ggt gca gtg gac gcg tgc cag gga gat tct ggt ggc cca cta gtc 1220
Thr Gly Ala Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
360 365 370

caa gaa gac tca cgg cgg ctt tgg ttc ctg gtg gga ata gtg agc tgg 1268
Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val Ser Trp
375 380 385

ggc tat cag tgt ggt gtg ccc gac aag ccc gga gta tat act cga gtg 1316
Gly Tyr Gln Cys Gly Val Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val
390 395 400 405

acc aca tac cgt aac tgg att aga caa gta act ggg gtc tag cgcaaccca 1367
Thr Thr Tyr Arg Asn Trp Ile Arg Gln Val Thr Gly Val
410 415 418

tgcatttctg ttgcaaagt atcaagtga ataatgcat ctctgttgca aagtcgaat 1427
gcaggigtgc ctggctacaa ttccaaagct ttacttttca gcagaaaaat aaagctgcgc 1487
ttgtttcatt ttacatact gttacaaaat agagcagaat aaaacattat tcactcttcc 1547
tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1576

64 / 79

<211> 418

<212> PRT

<213> *Cavia porcellus*

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)... (186)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)... (418)

<400> 37

Met Tyr Arg Pro Ala Thr Val Ser Ser Asn Ser Arg Phe Leu Asn Pro

1 5 10 15

Trp Val Val Phe Phe Thr Val Phe Ala Val Val Gly Ile Leu Ala Met

20 25 30

Ile Val Gly Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Cys

35 40 45

Phe Tyr His Ser Asp Val Gln Ile Met Asn Val Glu Tyr Asn Asp Gln

50 55 60

Leu Ser Ser Pro Gly Thr Gln Glu Tyr Arg Ile Leu Ser Glu Arg Ile

65 70 75 80

Glu Ser Met Ile Thr Asn Ala Phe Gln Gln Ser Asn Leu Arg Asn Gln

85 90 95

Phe Ile Arg Ala His Val Val Arg Leu Arg Gln Glu Gly Asn Gly Val

100 105 110

Val Ala Asp Val Val Met Lys Phe Arg Phe Ser Arg Arg Asn Asn Gly

115 120 125

Glu Ser Met Lys Ala Arg Ile Gln Ser Ile Leu Gln Gln Met Leu Asn

130 135 140

65/79

Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ser Ala Gly Val Thr Glu Ile
 145 150 155 160
 Asn Asp Gln Glu Thr Glu Asn Met Phe Thr Gln Ala Cys Gly Ala Arg
 165 170 175
 Pro Asp Leu Met Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Val Gly Gly Thr Gln
 180 185 190
 Ala Asp Gln Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Val Asn Gly
 195 200 205
 Gly His Arg Cys Gly Gly Val Leu Val Ser Asn Gln Trp Val Leu Thr
 210 215 220
 Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Pro Asn Ala Gln Gln Trp Thr Ala
 225 230 235 240
 Thr Phe Gly Ile Ser Thr Thr Ser Pro Thr Leu Arg Val Arg Val Arg
 245 250 255
 Thr Ile Ser Ile His Asn Asn Tyr Asn Pro Val Thr His Glu Asn Asp
 260 265 270
 Ile Ala Ala Val Gln Leu Glu Arg Ala Val Thr Phe Thr Arg Asp Val
 275 280 285
 His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Thr Val Thr Pro Gly Ser
 290 295 300
 Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Asn Thr
 305 310 315 320
 Val Arg Tyr Leu Arg Gln Gly Gln Val Gln Ile Ile Ser Thr Ser Glu
 325 330 335
 Cys Asn Ala Pro Ala Ser Tyr Asn Gly Ala Val Leu Pro Gly Met Leu
 340 345 350
 Cys Ala Gly Val Pro Thr Gly Ala Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser
 355 360 365
 Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val
 370 375 380
 Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Val Pro Asp Lys Pro Gly

66/79

385 390 395 400
 Val Tyr Thr Arg Val Thr Thr Tyr Arg Asn Trp Ile Arg Gln Val Thr
 405 410 415
 Gly Val
 418

<210> 38

<211> 1538

<212> DNA

<213> *Mesocricetus auratus*

<220>

<221> CDS

<222> (206)... (1459)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (206)... (760)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (761)... (1459)

<400> 38

gtcccagict ctaattctgg tcccaagtac agtggtgggt caagttcagt ctttcagact 60
 tgttttgcaa gttagggttt aattacatgg gatitccicc ttggcttca gatacacata 120
 gcacaaaaga gtcactcaat tgagtgggaa tcctaaagca tctggacaca cagaagaaag 180
 gacctcgcca ttactcagga gtaaa atg tat agg cca aga cca gtg ata cca 232

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Val Ile Pro

67 / 79

caa tca agg ttc ttc agt ccg ttt gta gtg gct ttt gtt gtc ata aca 280
Gln Ser Arg Phe Phe Ser Pro Phe Val Val Ala Phe Val Val Ile Thr
10 15 20 25

acR gta ctg atc ctg gcc atg act ata ggt cta ctt att cac ttc tta 328
Thr Val Leu Ile Leu Ala Met Thr Ile Gly Leu Leu Ile His Phe Leu
30 35 40

gct ttt gac aag aaa act tac ttt tac cac agc agc ttt caa atc cta 376
Ala Phe Asp Lys Lys Thr Tyr Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile Leu
45 50 55

aat gtt gaa tac act gag gct tta aat tcc cca gct aca cag gaa tac 424
Asn Val Glu Tyr Thr Glu Ala Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr
60 65 70

agg cat ttg agt gaa aga att gaa tct atg att act gat gca ttc cga 472
Arg His Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ser Met Ile Thr Asp Ala Phe Arg
75 80 85

gaa tca aat tta aga agt gag ttt atc aga aca cac gtt gtt aaa ctg 520
Glu Ser Asn Leu Arg Ser Glu Phe Ile Arg Thr His Val Val Lys Leu
90 95 100 105

agg aaa gaa ggg aat ggt gtg atc gca gat gct gtc atg aaa ttt cga 568
Arg Lys Glu Gly Asn Gly Val Ile Ala Asp Ala Val Met Lys Phe Arg
110 115 120

tct agt aaa cgc agc aat aga aaa tcc atg aaa aac aga att cat tct 616
Ser Ser Lys Arg Ser Asn Arg Lys Ser Met Lys Asn Arg Ile His Ser
125 130 135

gig cta caa ata ctg agt aac tct gga agt ttg gaa ata acc cct tca 664

Val Leu Gln Ile Leu Ser Asn Ser Gly Ser Leu Glu Ile Thr Pro Ser

140

145

150

aat gag ata aca tca ctc act gac caa gat aca gaa aat ttt ttg act 712

Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp Gln Asp Thr Glu Asn Phe Leu Thr

155

160

165

caa gaa tgt gga gcc cgt cca gac ctt ata aca ctg tca gaa gag aga 760

Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg

170

175

180

185

gtt att gga ggc act cta gct gaa aca ggt gac tgg ccc tgg caa gtc 808

Val Ile Gly Gly Thr Leu Ala Glu Thr Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val

190

195

200

agt cta caa ctc aat aat gtc cac cac tgt gga ggt atc ctg atc agt 856

Ser Leu Gln Leu Asn Asn Val His His Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser

205

210

215

aac ttg tgg gtc ctg aca gca gct cac tgc ttc aga agc tac tct aat 904

Asn Leu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asn

220

225

230

cct cta caa tgg act gcc acc ttt ggt gtt tct aca ata cgt cct atc 952

Pro Leu Gln Trp Thr Ala Thr Phe Gly Val Ser Thr Ile Arg Pro Ile

235

240

245

tta aga gta aga gta agg tct att gta tcc cat aac aat tac aga cct 1000

Leu Arg Val Arg Val Arg Ser Ile Val Ser His Asn Asn Tyr Arg Pro

69 / 79

250 255 260 265

aca act cgt gat aat gat att gca gtt gta caa ctt gaa aga cct atc 1048
Thr Thr Arg Asp Asn Asp Ile Ala Val Val Gln Leu Glu Arg Pro Ile
 270 275 280

acc ttt aac aga aat atc cac agg gtg tgt ctc cca gct gcg acc caa 1096
Thr Phe Asn Arg Asn Ile His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln
 285 290 295

agt atc ata cct ggt tct att gca tat gtc aca gga tgg ggg tgc ctc 1144
Ser Ile Ile Pro Gly Ser Ile Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu
 300 305 310

act tat gga ggc aac aca gtc acc gat cta cgg caa gga cag gtc aga 1192
Thr Tyr Gly Gly Asn Thr Val Thr Asp Leu Arg Gln Gly Gln Val Arg
 315 320 325

ata gta agt acc gac gag tgc aat gaa cca gct ggg tac agt gga agc 1240
Ile Val Ser Thr Asp Glu Cys Asn Glu Pro Ala Gly Tyr Ser Gly Ser
330 335 340 345

gtc ttg cct gga atg ctc tgt gct gga gtg cct tca ggt gct gtc gat 1288
Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Val Pro Ser Gly Ala Val Asp
 350 355 360

gcg tgc caa ggt gat tct ggt ggc cca cta gta cag gaa gac tca cgg 1336
Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg
 365 370 375

atg ctt tgg ttt gtt gtc ggg att gta agc tgg gga tat cag tgc ggc 1384

70/79

Met Leu Trp Phe Val Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly

380

385

390

ctg cca aat aaa cca gga gtg tac acg cga gtg aca acc tac cgc gac 1432

Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr Thr Tyr Arg Asp

395

400

405

tgg att cgc cag caa gct gga gtc tag tgccacgaaa gtgctgtgaa gtttgtg 1486

Trp Ile Arg Gln Gln Ala Gly Val

410

415

417

tgcaaatgic ctagactcaga ttcaactgca aaagaaaccg gaatgtctat tt 1538

<210> 39

<211> 417

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)... (185)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (186)... (417)

<400> 39

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Val Ile Pro Gln Ser Arg Phe Phe Ser Pro

1

5

10

15

Phe Val Val Ala Phe Val Val Ile Thr Thr Val Leu Ile Leu Ala Met

20

25

30

71/79

Thr Ile Gly Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Lys Lys Thr Tyr
 35 40 45
 Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile Leu Asn Val Glu Tyr Thr Glu Ala
 50 55 60
 Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg His Leu Ser Glu Arg Ile
 65 70 75 80
 Glu Ser Met Ile Thr Asp Ala Phe Arg Glu Ser Asn Leu Arg Ser Glu
 85 90 95
 Phe Ile Arg Thr His Val Val Lys Leu Arg Lys Glu Gly Asn Gly Val
 100 105 110
 Ile Ala Asp Ala Val Met Lys Phe Arg Ser Ser Lys Arg Ser Asn Arg
 115 120 125
 Lys Ser Met Lys Asn Arg Ile His Ser Val Leu Gln Ile Leu Ser Asn
 130 135 140
 Ser Gly Ser Leu Glu Ile Thr Pro Ser Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr
 145 150 155 160
 Asp Gln Asp Thr Glu Asn Phe Leu Thr Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro
 165 170 175
 Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Val Ile Gly Gly Thr Leu Ala
 180 185 190
 Glu Thr Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn Asn Val
 195 200 205
 His His Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Asn Leu Trp Val Leu Thr Ala
 210 215 220
 Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asn Pro Leu Gln Trp Thr Ala Thr
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Ser Thr Ile Arg Pro Ile Leu Arg Val Arg Val Arg Ser
 245 250 255
 Ile Val Ser His Asn Asn Tyr Arg Pro Thr Thr Arg Asp Asn Asp Ile
 260 265 270
 Ala Val Val Gln Leu Glu Arg Pro Ile Thr Phe Asn Arg Asn Ile His

72 / 79

275 280 285
 Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ile Ile Pro Gly Ser Ile
 290 295 300
 Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu Thr Tyr Gly Gly Asn Thr Val
 305 310 315 320
 Thr Asp Leu Arg Gln Gly Gln Val Arg Ile Val Ser Thr Asp Glu Cys
 325 330 335
 Asn Glu Pro Ala Gly Tyr Ser Gly Ser Val Leu Pro Gly Met Leu Cys
 340 345 350
 Ala Gly Val Pro Ser Gly Ala Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly
 355 360 365
 Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Met Leu Trp Phe Val Val Gly
 370 375 380
 Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val
 385 390 395 400
 Tyr Thr Arg Val Thr Thr Tyr Arg Asp Trp Ile Arg Gln Gln Ala Gly
 405 410 415
 Val
 417

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

ctggccstgg caagtcagtc t. 21

73 / 79

<210> 41

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

gtgggtcctg acwgcmgcyc ayigctica 29

<210> 42

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

tgwgicttcy tgcactagyg ggccacc 27

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

74/79

caytgatmkc cccagctyac watbcccac 29

<210> 44

<211> 1998

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fused DNA for human EGF and human placental alkalyne phosphatase

<400> 44

atg aag ctg ctg ccg tcg gtg gtg ctg aag ctc ttt ctg gct gca gtt 48

Met Lys Leu Leu Pro Ser Val Val Leu Lys Leu Phe Leu Ala Ala Val

1

5

10

15

ctc tcg gca ctg gtg act ggc gag agc ctg gag cgg ctt cgg aga ggg 96

Leu Ser Ala Leu Val Thr Gly Glu Ser Leu Glu Arg Leu Arg Arg Gly

20

25

30

cta gct gct gga acc agc aac ccg gac cct ccc act gta tcc acg gac 144

Leu Ala Ala Gly Thr Ser Asn Pro Asp Pro Pro Thr Val Ser Thr Asp

35

40

45

cag ctg cta ccc cta gga ggc ggc cgg gac cgg aaa gtc cgt gac ttg 192

Gln Leu Leu Pro Leu Gly Gly Gly Arg Asp Arg Lys Val Arg Asp Leu

50

55

60

caa gag gca gat ctg gac ctt ttg aga gtc act tta tcc tcc aag cca 240

Gln Glu Ala Asp Leu Asp Leu Leu Arg Val Thr Leu Ser Ser Lys Pro

65

70

75

80

caa gca ctg gcc aca cca aac aag gag gag cac ggg aaa aga aag aag 288.

75/79

Gln Ala Leu Ala Thr Pro Asn Lys Glu Glu His Gly Lys Arg Lys Lys
85 90 95

aaa ggc aag ggg cta ggg aag aag agg gac cca tgt ctt cgg aaa tac 336
Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys Leu Arg Lys Tyr
100 105 110

aag gac ttc tgc atc cat gga gaa tgc aaa tat gtg aag gag ctc cgg 384
Lys Asp Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys Tyr Val Lys Glu Leu Arg
115 120 125

gct ccc tcc tgc atc tgc cac ccg ggt tac cat gga gag agg tgt cat 432
Ala Pro Ser Cys Ile Cys His Pro Gly Tyr His Gly Glu Arg Cys His
130 135 140

ggg ctg agc ctc cca gtg gaa aat cgc tta tat acc tat gac cac aca 480
Gly Leu Ser Leu Pro Val Glu Asn Arg Leu Tyr Thr Tyr Asp His Thr
145 150 155 160

acc atc ctg atc atc cca gtt gag gag gag aac ccg gac ttc tgg aac 528
Thr Ile Leu Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn
165 170 175

cgc gag gca gcc gag gcc ctg ggt gcc gcc aag aag ctg cag cct gca 576
 Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala
 180 185 190

cag aca gcc gcc aag aac ctc atc atc ttc ctg ggc gat ggg atg ggg 624
Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly
195 200 205

76/77

gtg tct acg gtg aca gct gcc agg atc cta aaa ggg cag aag aag gac 672

Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp

210

215

220

aaa ctg ggg cct gag ala ccc ctg gcc atg gac cgc ttc cca tat gtg 720

Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val

225

230

235

240

gct ctg tcc aag aca tac aat gta gac aaa cat gtg cca gac agt gga 768

Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly

245

250

255

gcc aca gcc acg gcc tac ctg tgc ggg gtc aag ggc aac ttc cag acc 816

Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr

260

265

270

att ggc ttg agt gca gcc gcc cgc ttt aac cag tgc aac acg aca cgc 864

Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg

275

280

285

ggc aac gag gtc atc tcc gtg atg aat cgg gcc aag aaa gca ggg aag 912

Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys

290

295

300

tca gtg gga gtg gta acc acc aca cga gtg cag cac gcc tcg cca gcc 960

Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala

305

310

315

320

ggc acc tac gcc cac acg gtg aac cgc aac tgg tac tcg gac gcc gac 1008

Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp

325

330

335

77/79

gtg cct gcc tgc gcc cgc cag gag ggg tgc cag gac atc gct acg cag 1056

Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln

340

345

350

ctc atc tcc aac atg gac att gac gtg atc cta ggt gga ggc cga aag 1104

Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys

355

360

365

tac atg ttt cgc atg gga acc cca gac cct gag tac cca gat gac tac 1152

Tyr Met Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr

370

375

380

agc caa ggt ggg acc agg ctg gac ggg aag aat ctg gtg cag gaa tgg 1200

Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp

385

390

395

400

ctg gcg aag cgc cag ggt gcc cgg tat gtg tgg aac cgc act gag ctc 1248

Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu

405

410

415

atg cag gct tcc ctg gac ccg tct gtg acc cat ctc atg ggt ctc ttt 1296

Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe

420

425

430

gag cct gga gac atg aaa tac gag atc cac cga gac tcc aca ctg gac 1344

Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp

435

440

445

ccc tcc ctg atg gag atg aca gag gct gcc ctg cgc ctg ctg agc agg 1392

Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg

78/79

450

455

460

aac ccc cgc ggc ttc ttc ctc ttc gtg gag ggt ggt cgc atc gac cat 1440

Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His

465

470

475

480

ggt cat cat gaa agc agg gct tac cgg gca ctg act gag acg atc atg 1488

Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met

485

490

495

ttc gac gac gcc att gag agg gcg ggc cag ctc acc agc gag gag gac 1536

Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp

500

505

510

acg ctg agc ctc gtc act gcc gac cac tcc cac gtc ttc tcc ttc gga 1584

Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly

515

520

525

ggc tac ccc ctg cga ggg agc tcc atc ttc ggg ctg gcc cct ggc aag 1632

Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys

530

535

540

gcc cgg gac agg aag gcc tac acg gtc ctc cta tac gga aac ggt cca 1680

Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro

545

550

555

560

ggc tat gtc ctc aag gac ggc gcc cgg ccg gat gtt acc gag agc gag 1728

Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu

565

570

575

agc ggg agc ccc gag tat cgg cag cag tca gca gtc ccc ctg gac gaa 1776

79/79

Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu

580

585

590

gag acc cac gca ggc gag gac gtg gcg gtg ttc gcg cgc ggc ccg cag 1824

Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln

595

600

605

gcg cac ctg gtt cac ggc gtg cag gag cag acc ttc ata gcg cac gtc 1872

Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val

610

615

620

atg gcc ttc gcc gcc tgc ctg gag ccc tac acc gcc tgc gac ctg gcg 1920

Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala

625

630

635

640

ccc ccc gcc ggc acc acc gac gcc gcg cac ccg ggt tac tct aga gtc 1968

Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Tyr Ser Arg Val

645

650

655

ggg gcg gcc ggc cgc ttc gag cag aca tga 1998

Gly Ala Ala Gly Arg Phe Glu Gln Thr

660

665

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 9/76, C12N 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10,
C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, G01N 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 9/76, C12N 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10,
C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, G01N 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissPort/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 699763 A (TEIJIN LTD.), 06 March, 1996 (06.03.96), & JP 8-89246 A	1-19, 24-27
X	Kazuyoshi YAMAOKA et al., Cloning and Characterization of cDNA for Human Airway Trypsin-like Protease. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 08 May, 1998, Vol.273, No.19, pages 11895-11901	1-19, 24-27
X	WO 99/38973 A2 (CORIXA CORPORATION), 05 August, 1999 (05.08.99), & EP 1051489 A	14-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing

date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is

cited to establish the publication date of another citation or other

special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other

means

"P" document published prior to the international filing date but later

than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or

priority date and not in conflict with the application but cited to

understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered novel or cannot be considered to involve an inventive

step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered to involve an inventive step when the document is

combined with one or more other such documents, such

combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 October, 2001 (18.10.01)

Date of mailing of the international search report
30 October, 2001 (30.10.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07349

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20-23
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The "methods of judging therapeutic effects" as set forth in the above claims are carried out as a part of a therapy and, therefore, substantially pertain to methods for treatment by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/76, C12N 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10,
C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, G01N 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/76, C12N 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10,
C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, G01N 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissPort/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 699763 A (TEIJIN LTD.) 6.3月.1996 (06.03.96) & JP 8-89246 A	1-19, 24-27
X	Kazuyoshi YAMAOKA et al., Cloning and Characterization of cDNA for Human Airway Trypsin-like Protease. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, May 8 1998, Vol. 273, No. 19, p. 11895-11901	1-19, 24-27
X	WO 99/38973 A2 (CORIXA CORPORATION) 5.8月.1999 (05.08.99) & EP 1051489 A	14-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.10.01

国際調査報告の発送日

30.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一



4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20-23 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
上記請求の範囲の「治療効果判定方法」は、通常、治療方法の一環として行われる方法であり、実質的に治療方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.